

VOLUMEN 25, N°3, SEPTIEMBRE - DICIEMBRE DE 2023



ISSN:1665-1456

BIOTECNIA

Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud editada por la Universidad de Sonora



BIOTECNIA, 2023, volumen 25, número 3 (septiembre - diciembre), es una publicación electrónica cuatrimestral de acceso abierto editada por la Universidad de Sonora, a través de la Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo electrónico: biotecnia.difusion@unison.mx. Editor responsable del número: Jesús Adriana Soto Guzmán.

Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 04-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se autoriza la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes en la presente publicación, siempre y cuando se cuente con la autorización del editor y se cite plenamente la fuente.



La revista Biotecnia se encuentra bajo la licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

Artículos originales

- pp. 5 - 15 Morfología de nanopartículas de óxido de zinc modifica la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de pimiento morrón.
- pp. 16 - 24 Respuesta agronómica y metabolómica de plántulas de melón (*Cucumis melo L.*) bajo la aplicación de altas concentraciones de ácido indol-3-acético.
- pp. 25 - 35 Aislamiento e identificación de levaduras de la microbiota asociadas a la degradación lignocelulósica de *Euryphia cordifolia* (Palo podrido) con actividad enzimática celulolítica, xilanolítica y lacasa.
- pp. 36 - 41 Cambios bioquímicos y morfométricos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo.
- pp. 41 - 47 Selección multimodelo en la estimación de los parámetros de crecimiento de la sardina crinuda azul *Opisthonema bulleri* en el sur del Golfo de California.
- pp. 48 - 54 Caracterización morfológica y determinación de la diversidad genética de aguacate criollo *Persa americana* Mill de Parras, Coahuila.
- pp. 54 - 64 Caracterización estructural y funcional de nanopartículas de ZnO-EPS sintetizadas a partir de exopolisacáridos producidos por *Lactiplantobacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG.
- pp. 64 - 70 Crecimiento, biomasa, rendimiento y componentes de canola (*Brassica napus L.*) en respuesta a la fuente nitrogenada.
- pp. 71 - 78 Efectividad de un programa escolar de prevención de obesidad sobre el puntaje Z de IMC y grasa corporal a 6 meses en niños mexicanos: estudio piloto de un ensayo controlado aleatorio por conglomerados.
- pp. 79 - 84 Calidad física y rendimiento del grano de frijol azufrado en el norte de Sinaloa.
- pp. 85 - 92 Diseños factoriales completos de experimentos para optimizar un ELISA que detecta anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 en leche materna.
- pp. 93 - 104 Estatus de la resistencia bacteriana en un hospital de nivel 2 en el noroeste de México en 2016.
- pp. 105 - 112 Prevalencia de resistencia bacteriana de 2016 a 2018 en el Hospital General de Obregón, Sonora.
- pp. 113 - 124 Oreganón, perejil, cilantro, hierbabuena y albahaca a través de difracción de rayos x.
- pp. 125 - 139 Síntesis de Nanopartículas Metálicas Usando Extractos Naturales de Plantas: Mecanismos de Síntesis y Aplicaciones.

Artículos originales

- pp. 140 - 145 Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en pollos parrilleros de una planta frigorífica en Paraguay.
- pp. 146 - 153 Asociación entre la composición corporal, fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico en los jugadores del rugby sevens universitario.
- pp. 154 - 161 Efecto de extractos de *Citrus sinensis* (Rutaceae) y *Trichilia havanensis* (Meliaceae) en mortalidad y repelencia de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae).
- pp. 162 - 169 Extractos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. y su efecto alelopático sobre arvenses.
- pp. 170 - 175 Etapas del protocolo de crioconservación y su efecto sobre la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinífera* L.).
- pp. 176 - 183 Actividad antimicrobiana y antibiopelícula del extracto vegetal *Sambucus canadensis* en bacterias patógenas transmitidas por alimentos.
- pp. 184 - 188 Calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con diferentes formas clínicas de COVID-19, Sonora, México.
- pp. 189 - 196 Preparación controlada y actuación química de microfibras de poliacrilonitrilo.
- pp. 197 - 207 Efecto de biofertilizantes líquidos, obtenidos a partir de halófitas, en la germinación y emergencia de cuatro especies de hortalizas (*Daucus carota* L., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L. y *Cucumis sativus* L.)
- pp. 208 - 220 Caracterización integral del residuo generado durante la decocción de cálices de jamaica con uso potencial como ingrediente funcional.

Zinc oxide nanoparticle morphology modify germination and early growth of bell pepper seedlings

Morfología de nanopartículas de óxido de zinc modifica la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de pimiento morrón

Magdaleno-García Guadalupe¹, Juárez-Maldonado Antonio², Betancourt-Galindo Rebeca³, González-Morales Susana¹, Cabrera-De La Fuente Marcelino¹, Sánchez-Vega Miriam⁴, Méndez-Lopez Alonso^{2*}

¹ Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 25315, Coahuila, México. lupita.magdaleno@hotmail.com; qfb_sgm@hotmail.com, orcid.org/0000-0001-5734-6086; cafum7@hotmail.com, orcid.org/0000-0001-9866-9244

² Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 25315, Coahuila, México. juma841025@hotmail.com, orcid.org/0000-0003-3061-2297

³ Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Herмосillo No. 140, Saltillo 25294, Coahuila, México. rebecca.betancourt@ciqa.edu.mx, orcid.org/0000-0003-2550-2093

⁴ Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 25315, Coahuila, México. mirisanve@gmail.com, orcid.org/0000-0001-9866-9244; alonso1977@gmail.com, orcid.org/0000-0002-4356-0409

ABSTRACT

Nanotechnology has the potential to improve several processes in agriculture, including seed germination, growth, and crop productivity. In this work, the effect of priming RZ F1 (35-71) pepper seeds with zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) with different morphology: spherical and hexagonal, and at different doses, 50 and 100 mg L⁻¹, was studied. The study was carried out in two phases. The *in vitro* phase, where early growth variables were evaluated: germination percentage, radicle, plumule and hypocotyl length; and the greenhouse phase, where plant height, stem diameter, dry weight, leaf area, total chlorophyll, and phenols were evaluated, 45 days after planting. Seed priming with ZnO NPs showed a positive influence, with spherical morphology at a 100 mg L⁻¹ dose giving the best results for early growth parameters, as well as for plant height, stem diameter, leaf area, and total chlorophyll. These results suggest that ZnO NPs can be considered a seed conditioner to improve germination, early growth parameters and chlorophyll content.

Keywords: Nanoparticles, Morphology, Zinc, Seed priming, Bell pepper.

RESUMEN

La nanotecnología tiene el potencial para mejorar diversos procesos en la agricultura, entre ellos la germinación de semillas, el crecimiento y la productividad de los cultivos. En este trabajo se estudió el efecto del cebado de semillas de pimiento RZ F1 (35-71) con nanopartículas de óxido de zinc (NPs de ZnO) con diferente morfología: esférica y hexagonal, y diferentes dosis, 50 y 100 mg L⁻¹. El estudio se llevó a cabo en dos fases. Fase *in vitro*, donde se evaluaron variables de crecimiento temprano: porcentaje de germinación, longitud de radícula, plúmula e hipocótilo; Fase en invernadero, donde se evaluó altura de planta, diámetro de tallo, peso seco, área foliar, clorofila total y fenoles, a los 45 días de la siembra.

El cebado de semillas con NPs de ZnO mostró una influencia positiva, siendo la morfología esférica a dosis de 100 mg L⁻¹ la que dio los mejores resultados para los parámetros de crecimiento temprano, así como para la altura de planta, diámetro del tallo, área foliar y clorofila total. Estos resultados sugieren que las NPs de ZnO pueden considerarse un acondicionador de semillas para mejorar la germinación, los parámetros de crecimiento temprano y el contenido de clorofila.

Palabras clave: Nanopartículas, morfología, zinc, cebado de semillas, pimiento.

INTRODUCTION

Nanotechnology has the potential to revolutionize agriculture and play an important role in food and crop production (Parisi *et al.*, 2015). The term "nanotechnology" can be defined as the design, synthesis, manipulation and application of atomic or molecular aggregates between 1 and 100 nm (Hajra and Mondal, 2017). During the last years, a number of patents with nanoparticles (NPs) have been incorporated into agricultural practices, such as nano pesticides, nano fertilizers, and nano sensors, which have been developed with the collective objective of promoting efficiency and sustainability of agricultural practices, which requires less inputs and generate less waste than conventional products and approaches (Liu and Lal, 2015).

Essential microelements play an important role in plant growth, development and yield. Zinc is an essential micronutrient for humans, animals and plants, and the latter generally absorb Zn as a divalent cation (Zn⁺⁺). Zinc is necessary in protein biosynthesis and carbohydrate metabolism, and plays an important role in gene expression related to environmental stress (Hawkesford and Barraclough, 2011).

NPs can be synthesized from a variety of bulk materials, and their actions depend on their morphology, surface area, size distribution and other parameters, which are the most

*Correspondence author: Alonso Méndez López
Correo-e: alonso1977@gmail.com

Received: December 4, 2022

Accepted: May 5, 2023; Published: September 1, 2023

remarkable key factors that can determine NPs activity (Abramenko *et al.*, 2018; Brunner *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2021). It has been clearly demonstrated that the electromagnetic, optical, catalytic, sensory, thermal and mechanical properties are strongly influenced by their shape and size (Sau and Rogach, 2010). As their size decreases, NPs surface area increases (Khademalrasool *et al.*, 2021). As for morphological change, it is a consequence of complex combinations of molecules, surfaces and crystals; in regards to this, a greater antibacterial activity of spherical NPs has been described as a result of the high surface/volume ratio and its isotropic geometry, compared to the anisotropic geometry (Agnihotri *et al.*, 2014; Mokhtari *et al.*, 2009; Shenashen *et al.*, 2014). ZnO NPs morphology affects their interaction with cell membranes, as well as their cell penetration capacity (Peng *et al.*, 2011). Therefore, nanoparticle shape may influence the way in which the nanomaterial will interact with the environment because of the geometric effect. Thus, the importance to understand how the physicochemical properties of the NPs are related to their biological interactions and functions.

Positive effects related to spherical and hexagonal ZnO nanoparticle use on the growth and quality of agricultural value crops, such as tomato and wheat, have been reported (Faizan *et al.*, 2018; Munir *et al.*, 2018; Pérez-Velasco *et al.*, 2021). NPs can be applied to plants in different ways; however, seed priming is considered an easy method that can bring benefits during the early stages of growth (Mahakham *et al.*, 2017). Seed priming stimulates processes involved in metabolism, prevents seed deterioration, breaks dormancy and induces a systematic resistance against biotic and abiotic stress, besides biochemical and physiological changes that occur when carrying out a seed priming treatment before germination and radicle emergence (Rehman *et al.*, 2011). Priming is an approach that implies seed treatment with different inorganic chemical compounds or with low or high temperatures (Kamithi *et al.*, 2016). Application of ZnO NPs for seed preparation on different crops, such as maize, where a 100 mg L⁻¹ dose improved germination and increased growth parameters has been reported (Itrotwar *et al.*, 2020); whereas in wheat, a significant positive influence in yield, germination and vigor index was reported for a 10 mg L⁻¹ dose (Rai-Kalal and Jajoo, 2021).

Bell pepper (*Capsicum annuum* L.), which belongs to the Solanaceae family, is a vegetable present in the diet of many populations around the world; and represents an important source of income for farmers and agro-processing sector operators (Fратиanni *et al.*, 2020). In this context, this research aimed to study the effect of seed nano priming with two morphology types of ZnO NPs on germination and early growth of bell pepper seedlings.

MATERIAL AND METHODS

Geographic location

Experimental testing was carried out in the Ecology Laboratory located in Plant Physiology area of the Botany Department at the Antonio Narro Autonomous Agrarian University, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Plant Material

Hybrid bell pepper seeds RZ F1 (35-171) were used, which is a bell pepper of excellent vigor and high production from the Rijk Zwaan seed company.

Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles

Nanoparticle synthesis was done at the Applied Chemistry Research Center (CIQA). Zinc acetate dihydrate (Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O, ZnAc, 99 %), triethylamine (TEA, 99 %), n-propylamine (C₃H₉N, 99.5 %), industrial use ethanol and triply-distilled deionized water were used. Sigma Aldrich provided all the reagents.

ZnO NPs were prepared according to the methodology described by González *et al.* (2021). The synthesis was made by mixing two solutions. The first contained 8.928 g of ZnAc dissolved in a water/TEA (300 mL/5.36 mL) mixture, and the second was a n-propylamine/ethanol (1.42 mL/ 1700 mL) mixture. Both solutions were mixed and stirred at 80 °C for 6 or 12 h, depending on the desired structure. The precipitate was centrifuged, washed with ethanol to remove excess reagents, and dried overnight at room temperature for 12 h. ZnO NPs with different reaction times were prepared to obtain different spherical and hexagonal morphologies.

ZnO NPs crystalline structure was determined by X-Ray Diffraction (XRD), performed in a Siemens D-5000 diffractometer (CuKα radiation, = 1,5418 Å, SIEMENS, Munich, GER). The size of the crystal was determined according to the Debye-Scherrer equation. ZnO NPs morphology was observed by High-resolution transmission electron microscopy (FEI Titan 80 – 300 kV HRTEM, Hillsboro, OR, USA).

Zinc oxide nanoparticle seed priming (spherical and hexagonal morphology)

Zinc oxide nanoparticle solutions were prepared from a spherical and hexagonal zinc oxide nanoparticle 5000 mg L⁻¹ stock solution by weighing 1 g of NPs; then, 200 mL of distilled water were added. Subsequently, the elements were dispersed with a sonicator (Vevor) for 30 min at 25 °C, in order to form a homogeneous suspension and avoid nanoparticle agglomeration. From this solution, 50 and 100 mg L⁻¹ dilutions were made.

The seeds were placed in 90 x 15 mm Petri dishes, with Whatman 1 (110 mm) filter discs and soaked in different concentrations of ZnO NPs (0, 50 y 100 mg L⁻¹). Fifteen mL of a ZnO NPs suspension from each treatment were taken, and then added to the seeds for the imbibition. The seeds were left in darkness at 28 ± 1 °C for 18 h in an incubator (Model 12-140, Quincy Lab Inc.). Primed seeds were left to rest at room temperature until the original moisture content was reached. Distilled water was used for priming.

Germination stage

ZnO NPs primed seeds were placed in 90 x 15mm Petri dishes under the following treatments: T1: 0 mg L⁻¹, distilled water (control); T2: 50 mg L⁻¹ spherical ZnO NPs; T3: 100 mg L⁻¹ spherical ZnO NPs; T4: 50 mg L⁻¹ hexagonal ZnO NPs; T5: 100 mg L⁻¹ hexagonal ZnO NPs.

Ten seeds per dish per treatment were placed in Whatman 1 (110 mm) filter discs, considering six replicas per treatment. The seeds were germinated in darkness at 28 ± 1 °C in an incubator (Model 12 - 140, Quincy Lab Inc.) (Upadhyaya *et al.*, 2017).

After the radicle length exceeded 2 mm, germination parameters were registered daily. Germination rate was calculated as the relation between the number of sprouted seeds and the total amount of seeds sown, expressed as a percentage (Ng *et al.*, 2012). Fourteen-day seedlings were measured, taking radicle, hypocotyl, and plumule length with a TRUPER LCD Display digital caliper (150 mm). The results were registered in mm (Abou-Zeid and Ismail, 2018).

Greenhouse stage (45 days)

Ten replicas of each treatment were taken from Petri dishes and seedlings were transplanted to Styrofoam cups with a 500 mL capacity, which contained a mixture of peat moss + perlite (1:1 v/v). Plant nutrition was provided since the transplant, with a Steiner solution (Steiner, 1961) at a 25 % concentration. The seedlings were kept for 45 d in a polycarbonate-covered greenhouse during their growth, with a 22 °C average temperature and a relative humidity of 56 %.

Measurement of variables

Agronomic variables were registered: plant height was taken from the stem base to the plant apex, with a 5-meter flexometer (Model PRO-5MEC, TRUPER) every five days from the transplant until 45 d after; stem diameter was measured 45 d after the transplant with an LCD Display digital caliper (TRUPER, 150 mm) and registered in mm; number of leaves were counted every five days from the transplant until 45 d after, at the end of the cycle; aerial part dry weight was determined at the end of the cycle, separating leaves and stem; these parts were placed in marked paper bags and dehydrated in a drying oven (Model GO1350C-1 Linderberg/blue) at 80 °C for 24 h. The samples were weighed on an electronic scale (0.1/5000 g); for root dry weight, they were separated manually from the substrate in the cup, removing excess substrate with water. Then, roots were weighed in an electronic scale (0.1/5000 g). To obtain the dry weight, roots were placed in paper bags and dehydrated in a drying oven (Model GO1350C-1 Linderberg/blue) at 75 °C for 17 h. Finally, the samples were weighed on the scale.

Leaf area

Destructive plant testing was carried out and each leaflet from an individual plant was scanned with a leaf area meter (LI-3100C). The leaves were placed precisely and completely extended between the two transparent belts before scanning. This process guaranteed an accurate area representation in each measurement.

Chlorophyll content

Chlorophyll content was determined according to Nagata and Yamashita (1992). For this purpose, 0.1 g of lyophilized

leaf tissue was used, mixed with 2 mL of hexane:acetone solution (3:2). An aliquot of the supernatant was taken, and the absorbances were measured at 645 and 663 nm. These results were used to determine chlorophyll content according to the equations:

$$1) \text{ Chl a} = .999 \times \text{Abs663} - 0.0989 \times \text{Abs645}$$

$$2) \text{ Chl b} = -0.328 \times \text{Abs663} + 1.77 \times \text{Abs645}$$

$$3) \text{ Chl total} = \text{chlorofila a} + \text{chlorofila b}$$

All data were expressed in mg 100 g⁻¹ dry weight.

Quantification of total phenolic content

Total phenolic content in leaf extract was determined by the Folin-Ciocalteu method, using gallic acid as a standard phenolic compound. The standard curve was obtained from serial dilutions from a 1000-ppm gallic acid stock solution. Phenolic compound quantification was determined according to the methodology of Singleton *et al.* (1999): 100 mg of extract were weighed in a 2 mL tube, and 1000 µL of water:acetone solution (1:1) were added. The sample was vortexed for 30 seconds, then sonicated (Ultrasonic Cleaner Branson 1510) for five minutes. The samples were centrifuged at 12500 rpm for 10 min at 4 °C in a microcentrifuge (Labnet Prism™ R); the supernatant was extracted and, subsequently, 17 µL of extract and 70 µL of Folin-Ciocalteu reagent were added to an Eppendorf tube, with 174 µL of 20 % sodium carbonate (Na₂CO₃). Then, 1740 µL of distilled water were added, the tube was vortexed for 30 sec and subsequently the samples were placed into a 45 °C water bath for 30 min. Absorbance was read at a 750 nm wavelength in a spectrophotometer (VE-5600 VELAB). Sample total phenolic content was expressed as milligram of gallic acid equivalents per gram, with the gallic acid (mg g⁻¹) calibration curve.

Statistical analysis

A completely random experimental design was used, with five treatments and six replicas, obtaining 30 experimental units. The experimental unit was a Petri dish with 10 seeds at the germination stage and a seedling with 10 replicas per treatment at the greenhouse stage. For data analysis, Infostat 2020 software was used (InfoStat 2020; Cordoba, Argentina). An analysis of variance (ANOVA) and a comparison of means using LSD Fisher test ($P \leq 0.05$) were conducted.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of zinc oxide NPs

The ZnO NPs morphology, observed by High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), reveals the presence of spherical NPs at 20.63 nm (Figure 1A). The histogram of the particle size distribution indicates that it ranges from 7.5 to 42.5 nm, with an average of 20 nm (Figure 1B). Moreover, for hexagonal NPs (Figure 2A), individual particles that range from 0.025 µm to 2.5 µm, with an average of 1.7

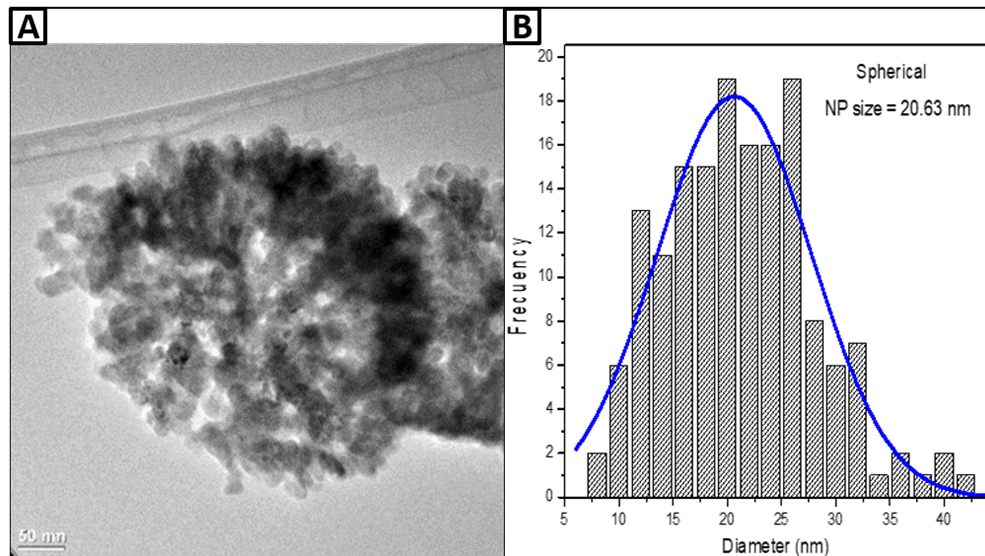


Figure 1. Transmission electron microscopy micrograph showing the spherical morphology of the ZnO NPs (A) and the particle size distribution histogram (B).

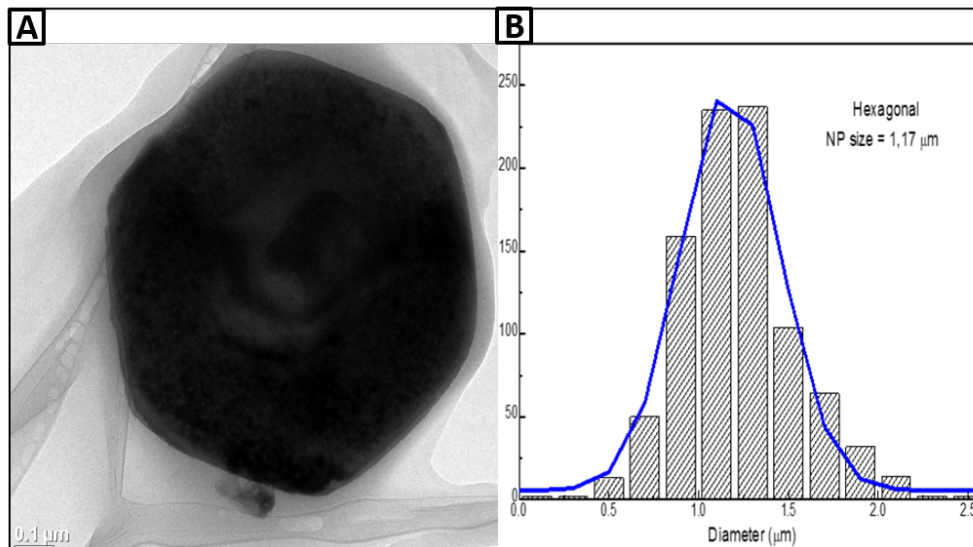


Figure 2. Transmission electron microscopy micrograph that shows the ZnO NPs hexagonal morphology (A) and particle size distribution histogram (B).

μm were shown. The morphology and size of the ZnO NPs observed are similar to the results reported by González *et al.* (2021), who conducted NPs synthesis to obtain spherical, hexagonal and rod NPs.

Effect of the ZnO NPs on germination

The results showed that germination percentage had statistically significant differences: the spherical nanoparticle treatment at 100 mg L^{-1} had a 13 % increase compared to the control (Figure 3D). These results differ from those reported by García-López *et al.* (2018), where no statistical differences in germination percentage of pepper seeds were found for $100, 200,$ and 500 mg L^{-1} 12-20 nm spherical zinc oxide nanoparticle concentrations. On the other hand, Mahakham *et*

al. (2017) calculated seed germination index (GI) and germination rate (GR) and found that the nano priming treatment with spherical silver NPs at 10 and 20 mg L^{-1} concentrations significantly increased the GI and GR values, compared to non-primed seeds. Nounjan *et al.* (2016), noted that priming treatment might improve seed water absorption since primed seeds showed faster imbibition than non-primed ones.

The mechanism behind high seed germination in nano priming is the higher penetration through the seed coat, which improves the efficiency of water and nutrient absorption (Dutta, 2018). As previously mentioned, morphology will have an impact on the interactions with cell membranes and, as for spherical NPs, will be due to their isotropic geometry that might provide higher reactivity (Agnihotri *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2011).

Germination increase with spherical ZnO NPs treatment at 100 mg L⁻¹ in our research could be due to the NPs size, which is within a 20.63 nm range, approximately smaller size compared to the hexagonal NPs. The difference may be interpreted from the surface/volume correlation point of view (Méndez-López *et al.*, 2022), since reducing nanoparticle size increases surface area, which may show a better reaction and smaller NPs can release more ions than larger NPs (Xiu *et al.*, 2012).

It has been reported that water absorption during the seed germination process is essential because ripe seeds are in the latency phase and need enough amount of water to start the metabolism and cell growth (Bewley *et al.*, 2013). Therefore, an increase in germination percentage may be due to an increase on the level of aquaporin transcription after the nanoparticle seed priming treatment. Aquaporins (water channels) are transmembrane proteins that not only facilitate water diffusion through biological membranes and regulate water homeostasis, but also transport gases such as CO₂ and nutrients (Maurel *et al.*, 2015).

In commercial agriculture, fast and uniform germination and seedling emergence are important determinants for good crop establishment (Chen and Arora, 2013; Méndez-López *et al.*, 2022). The germination starts with water uptake

by the dry ripe seed and ends with the embryonic axis elongation, usually the radicle, through the seed coat. The consequence is root protrusion, followed by shoot protrusion (Rajjou *et al.*, 2012).

The quantified results of radicle, hypocotyl and plumule length showed that spherical NPs at 100 mg L⁻¹ treatment caused a 79 % increase for radicle length and 22 % for hypocotyl, while hexagonal nanoparticle at 100 mg L⁻¹ treatment increased plumule length by 66 % compared to the control (Figures 3A, 3B, 3C). Li *et al.* (2021) reported similar results, indicating that root length improved substantially with 36 nm ZnO NPs at 50 mg L⁻¹ treatment. However, Singh *et al.* (2018) showed that growth increased at its maximum in 50 mg L⁻¹ treated seedlings; while above 100 mg L⁻¹, namely, 500 and 1000 mg L⁻¹, ± 36 nm ZnO NPs had phytotoxic effects on rice seedling growth.

Prasad *et al.* (2012) also reported an improvement in the growth, development, and yield of peanut plants with low concentrations of 25 nm spherical ZnO NPs, since the plants absorb them at a higher degree than bulk ZnSO₄. Moreover, it was reported that 18 nm ZnO NPs (20 and 30 mg L⁻¹) treated onion plants (*Allium cepa* L.) registered better and earlier growth than the control (Lawre *et al.*, 2014). Positive effects of zinc oxide NPs in early growth parameters

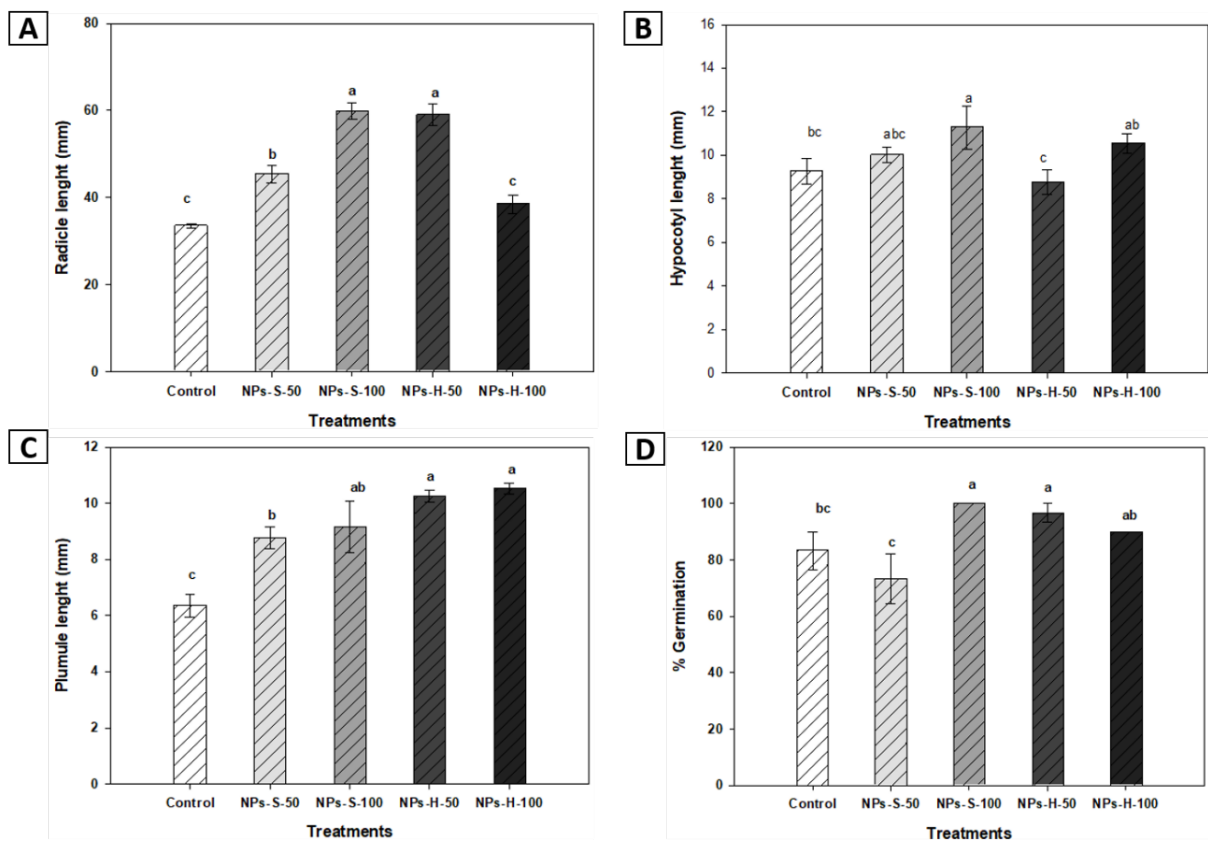


Figure 3. Radicle length (A), Hypocotyl length (B), Plumule length (C) and Germination percentage (D), of bell pepper seedlings at 14 DAS. NPs-S-50: spherical nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-S-100: spherical nanoparticles 100 mg L⁻¹, NPs-H-50: hexagonal nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-H-100: hexagonal nanoparticles 100 mg L⁻¹. Different letters indicate significant difference (LSD, ≤ 0.05). Lines over the bars indicate mean standard error.

on bell pepper seedlings may be attributed to the action of zinc as an essential micronutrient for a variety of important activities in the cell membrane, such as cell elongation and protein biosynthesis in plant growth (Boonchuay *et al.*, 2013; Cakmak, 2000; Welch, 1982).

On the other hand, morphology has been described as an important factor in NPs, potentially affecting their interaction with cell membranes, as well as their cell penetration capacity (Peng *et al.*, 2011). Therefore, nanoparticle shape also affects their cell absorption. In this regard, it has been mentioned that spherical NPs show higher absorption rates compared to rod-shaped and cylindrical NPs (Chithrani and Chan, 2007; Zhao and Stenzel, 2018); although conflicting evidence has been reported, which suggests the complexity of the nano-bio interactions (Park *et al.*, 2008).

Nanoparticle physicochemical properties interact with biological systems. This means that morphology will have an impact by interacting with the plant; its interaction with cell membrane proteins and receptors is determined by the NP design, which in fact, affects cell uptake, gene expression and toxicity. NPs can interact with the cell surface membrane in multiple scenarios (Albanese *et al.*, 2012). Nanoparticle shape affects cellular uptake directly: stick-shaped NPs show greater uptake, followed by spherical, cylindrical and cubic NPs (Gratton *et al.*, 2008).

Early growth parameters of bell pepper seedlings

Plant early growth parameters, such as height, stem diameter, leaf number, aerial part dry weight, root dry weight and leaf area were affected by the zinc oxide NPs used in the research (Figure 4). The best results were obtained with spherical NP treatment at a 100 mg L⁻¹ concentration, with a 25 % increase in plant height, and a 15 % increase in stem diameter, compared to the control. As for leaf number, hexagonal NP treatment at 50 mg L⁻¹ showed the best results, with a 13 % increase (Figure 4). Regarding aerial part dry weight, spherical NP treatment at 100 mg L⁻¹ and hexagonal NP treatment at 50 mg L⁻¹ were proved to be statistically equal, with a 78 % and 85 % increase, respectively, compared to the control (Figure 4E). Meanwhile, for root dry weight, a 61 % increase was observed due to hexagonal NP treatment at 100 mg L⁻¹ (Figure 3D). Regarding leaf area, spherical NP treatment at a 100 mg L⁻¹ concentration stimulated a 13 % increase in comparison with the control (Figure 4F).

These results are similar to those of Munir *et al.* (2018), who reported that at a 100 mg L⁻¹ concentration of 34 nm hexagonal ZnO NPs, an increase in plant height, tiller number, spike length, shoot dry weight and root dry weight was observed. Likewise, an increase in plant growth on mung bean (*Vigna radiata*) was registered, by using 20 nm spherical NPs at 20 mg L⁻¹, in chickpea (*Cicer arietinum*) and cucumber (*Cucumis sativus*), with 10 nm spherical NPs, at 400 and 800 mg kg⁻¹. In addition, it has been mentioned that dry biomass significantly increases with the ZnO NPs application at low concentrations (Liu and Lal, 2015; Mahajan *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). Faizan *et al.* (2018) reported that an 8 mg L⁻¹

concentration of 35 nm spherical ZnO NPs increased leaf area by 29.9 % compared to the control on tomato plants. Leaf area is an important plant parameter, so both farmers and scientists can monitor or model plant growth and well-being (Pokovai and Fodor, 2019). Leaves represent most of the canopy surface of field crops and are the main interface for energy and mass exchange between the atmosphere and plants. The important processes, such as the canopy light interception, deposition of nutrients, transpiration, respiration and assimilation, are directly proportional to the leaf surface (Rundquist *et al.*, 2014).

ZnO NPs application through seed nano priming treatment improved vegetative growth on bell pepper (*Capsicum annuum*), including seedling early growth variables. This improvement may be attributed to the Zn role in tryptophan synthesis, a prerequisite for the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA). Zinc oxide NPs can also modulate the biosynthesis of the phytohormones cytokinins and gibberellins, which may lead to an increase in the number of internodes per plant (Sturikova *et al.*, 2018). Moreover, improved cell elongation may lead to an increase in plant height in the early stages of plant development (Sharifi, 2016). Mahdih *et al.* (2018) reported maximum improvement in plant height on pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with ZnO NPs seed treatment.

Similarly, the effects can be attributed to the interaction of NPs with cell surface membranes; the interaction between the NP-bound ligands and cellular receptors depends on the designed geometry; thus, the NPs acts as a scaffold whose design dictates the number of ligands that will interact with the receptor target (Albanese *et al.*, 2012).

Non-enzymatic antioxidant compounds

The application of spherical nanoparticles induced an increase in chlorophyll content in leaves of bell pepper plants, obtaining the best results with a 100 mg L⁻¹ concentration. Chlorophyll a content in leaves was higher with spherical NP treatment at 100 mg L⁻¹, showing a 78 % increase compared to the control (Figure 5A). Meanwhile, chlorophyll b content showed a 92 % increase with spherical ZnO NP priming at 50 mg L⁻¹ (Figure 5B). Total chlorophyll content was higher with spherical nanoparticles at 50 and 100 mg L⁻¹, increasing by 59 and 56 %, respectively, compared to the control (Figure 5C). Regarding phenolic content, it increased with spherical NP treatment at 100 mg L⁻¹ and hexagonal NPs treatment at 50 and 100 mg L⁻¹, which were statistically equal between them but significantly superior to the control treatment (Figure 4). Our results differ from those reported by Chen *et al.* (2018), who evaluated 50 nm spherical ZnO NP treatments at 25, 50 and 100 mg L⁻¹, and registered a negative effect in chlorophyll synthesis and rice seedling growth in hydroponic culture. Munir *et al.* (2018), reported that total chlorophyll content increased with hexagonal NPs at 100 mg L⁻¹. In contrast, Faizan *et al.* (2018) state that photosynthetic pigments improved with ZnO NPs treatments, obtaining a maximum chlorophyll content observed in plants treated with 35 nm spherical NPs at 8 mg L⁻¹. Govorov and Carmeli (2007) repor-

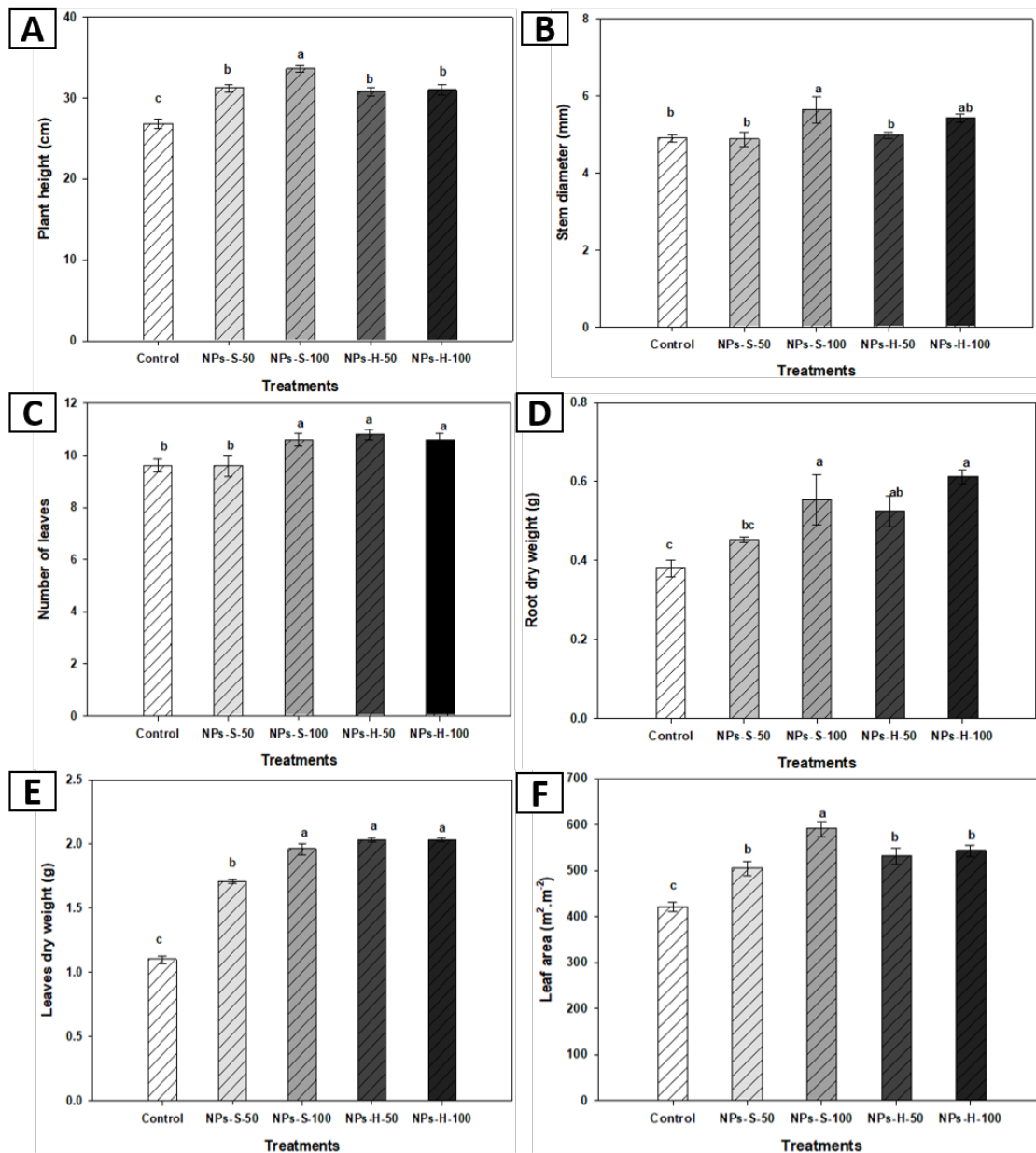


Figure 4. Plant height (A), stem diameter (B), leaf number (C), root dry weight (D), leaf dry weight (E), leaf area (F) of bell pepper seedlings at 45 days. NPs-S-50: spherical nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-S-100: spherical nanoparticles 100 mg L⁻¹, NPs-H-50: hexagonal nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-H-100: hexagonal nanoparticles 100 mg L⁻¹. Different letters in bars indicate a significant difference (LSD, ≤ 0.05). Lines over the bars indicate mean standard error.

ted that metallic NPs may induce the efficiency of chemical energy production in photosynthetic systems.

A positive effect of the NPs in chlorophyll synthesis may be associated with the essential role of Zn biosynthesis in this compound (Sturikova *et al.*, 2018) through the participation in LHC (light-harvesting complex) protein synthesis (Wang and Grimm, 2021), a family of proteins involved in chlorophyll synthesis regulation. Zinc also takes part in chloroplast development, as well as in the photosystem II repair process by recycling damaged D1 protein (Hänsch and Mendel, 2009). Besides, spherical NPs have been reported to regulate protein build-up, such as kinase 2 from the cell division cycle

and protochlorophyllide oxidoreductase (Syu *et al.*, 2014). These results suggest that spherical morphology may have higher reactivity in the production of this enzyme, which catalyzes a vital step in chlorophyll biosynthesis, acting as a key regulator. Furthermore, the reduction of spherical NPs size leads to a surface area increase, which may be related with a higher photocatalytic activity (Nguyen *et al.*, 2021).

According to our results, ZnO NPs application in seed nano priming increased total phenols in bell pepper leaves. Phenylpropanoid pathway produces different secondary metabolites as defense mechanisms (Nazerieh *et al.*, 2018). Garza *et al.* (2021) studied the effect of moringa (*Moringa oleifera*)

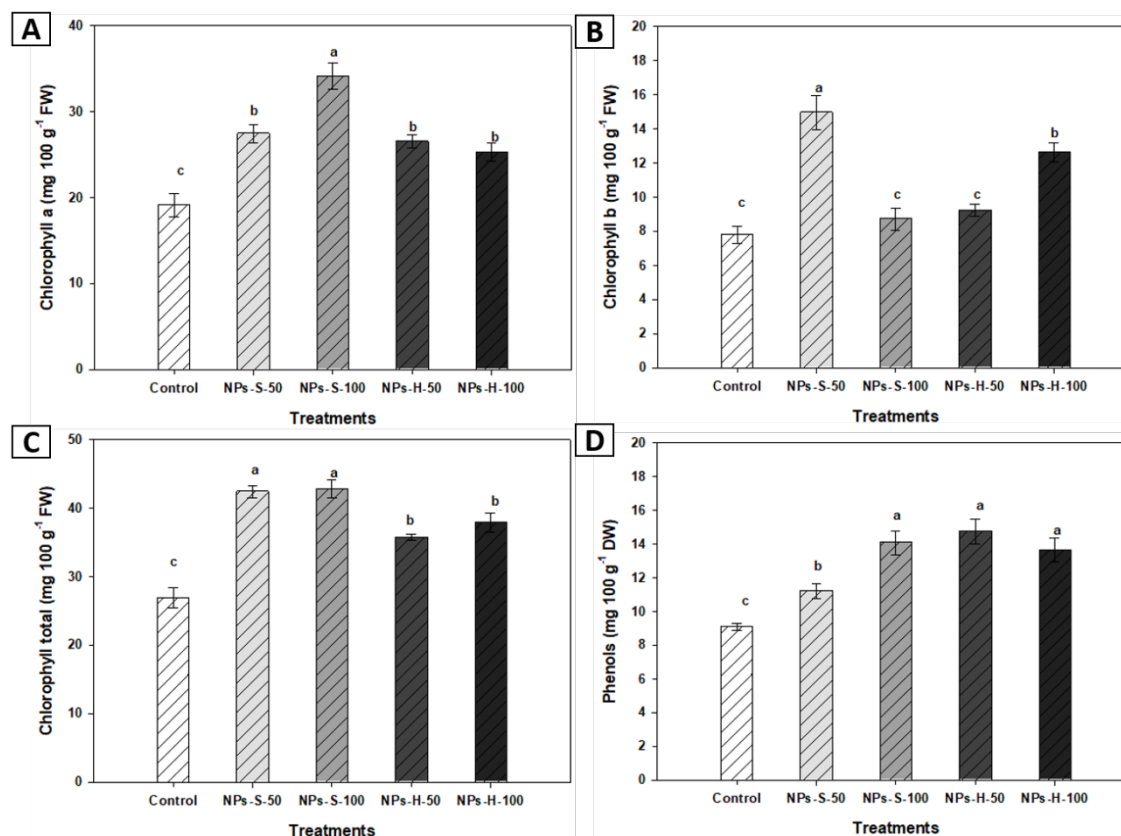


Figure 5. Chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C), and total phenols (D) of bell pepper seedlings at 45 DAS. NPs-S-50: spherical nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-S-100: spherical nanoparticles 100 mg L⁻¹, NPs-H-50: hexagonal nanoparticles 50 mg L⁻¹, NPs-H-100: hexagonal nanoparticles 100 mg L⁻¹. Different letters in the bars indicate significant difference (LSD, ≤ 0.05). The lines over the bars indicate mean standard error.

seed treatment with 16.49 nm spherical ZnO NPs at 7.5 and 10 mg L⁻¹ concentrations, reporting a significant increasing effect in phenolic content, of 13 and 11 % respectively, compared to the control. The increase in these compounds can be attributed to the interaction of nanomaterials with plant cells (Juárez-Maldonado *et al.*, 2019). Likewise, Zafar *et al.* (2016) carried out a study about the effect of ZnO NPs (1, 5, 10, 20 mg L⁻¹) (100 nm) in black mustard (*Brassica nigra*) under *in vitro* conditions and a concentration-dependent increase in total phenol content was found. Phenolic compounds play an important role in the non-enzymatic system. When the plant undergoes heavy metal stress, in this case, due to the ZnO NPs, phenolic compounds may act as metal-chelating agents or suppress reactive oxygen species (ROS) (Michalak, 2006).

NPs properties depend mainly on size and shape. For instance, nanospheres have been reported to have high biological activity (Liu *et al.*, 2004). Besides, a nanoparticle of the same composition but a different nanostructure, in this case, nanosphere, may lead to a higher bio-availability of the elemental composition of NPs (Aguilar-Tapia and Zanella, 2018; Nel *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS

The application of zinc oxide NPs as seed nanoprimer improved germination and early growth of bell pepper

seedlings. Besides, ZnO NPs treatments proved to be better to increase total chlorophyll and phenolic content in leaf, generally with the application of spherical nanoparticles at 100 mg L⁻¹, therefore, nanoparticle use in seed treatment may help homogenize germination and improve bell pepper plant growth and development, acting as a stimulant.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Antonio Narro Autonomous Agrarian University (UAAAN) for the internal project sponsor, code: 38111-425104001-2478.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest related to this article.

REFERENCES

- Abou-Zeid, H. and Ismail, G. 2018. The role of priming with biosynthesized silver nanoparticles in the response of *Triticum aestivum* L. to salt stress. *Egyptian Journal of Botany*. 58(1): 73–85. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2017.1873.1128>
- Abramenko, N.B., Demidova, T.B., Abkhalimov, E.V., Ershov, B.G., Krysanov, E.Y. and Kustov, L.M. 2018. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials*. 347: 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.060>

- Agnihotri, S., Mukherji, S. and Mukherji, S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*. 4(8): 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>
- Aguilar-Tapia, A. and Zanella, R. 2018. Las nanopartículas bimetalicas y algunas de sus aplicaciones. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*. 10(19): 72. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2017.19.61783>
- Albanese, A., Tang, P.S. and Chan, W.C. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 14: 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W. and Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edition. *Seed Science Research*. 23: 289. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Boonchuay, P., Cakmak, I., Rerkasem, B. and Prom-U-Thai, C. 2013. Effect of different foliar zinc application at different growth stages on seed zinc concentration and its impact on seedling vigor in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*. 59(2): 180–188. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.763382>
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. and Stark, W.J. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science and Technology*. 40(14): 4374–4381. <https://doi.org/10.1021/es052069i>
- Cakmak, I. 2000. Tansley review no. 111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist*. 146(2): 185–205. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x>
- Chen, J., Dou, R., Yang, Z., You, T., Gao, X. and Wang, L. 2018. Phytotoxicity and bioaccumulation of zinc oxide nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 130: 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.019>
- Chen, K. and Arora, R. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 94: 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.005>
- Chithrani, B.D. and Chan, W.C. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*. 7(6): 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>
- Dutta, P. 2018. Seed Priming: New Vistas and Contemporary Perspectives. In *Advances in Seed Priming*. Springer Nature. 1: 3–22. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5>
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S.T. and Hayat, S. 2018. Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*. 56(2): 678–686. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0717-0>
- Fратиanni, F., D'acerno, A., Cozzolino, A., Spigno, P., Riccardi, R., Raimo, F., Pane, C., Zaccardelli, M., Lombardo, V.T., Tucci, M., Grillo, S., Coppola, R. and Nazzaro, F. 2020. Biochemical characterization of traditional varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) of the campania region, southern italy. *Antioxidants*. 9(6): 1–16. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060556>
- García-López, J.I., Zavala-García, F., Olivares-Saénz, E., Lira-Saldivar, R.H., Barriga-Castro, E.D., Ruiz-Torres, N.A., Ramos-Cortez, E., Vázquez-Alvarado, R. and Ninõ-Medina, G. 2018. Zinc Oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. during germination. *Agronomy*. 8(10): 215. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100215>
- Garza-Alonso, C.A., González-García, Y., Cadenas-Pliego, G., Olivares-Sáenz, E., Trejo-Téllez, L.I. and Benavides-Mendoza, A. 2021. Seed priming with ZnO nanoparticles promotes early growth and bioactive compounds of *Moringa oleifera*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 49(4): 12546-12546. <https://doi.org/10.15835/nbha49412546>
- González, S.C., Bolaina-Lorenzo, E., Pérez-Trujillo, J.J., Puente-Urbina, B.A., Rodríguez-Fernández, O., Fonseca-García, A. and Betancourt-Galindo, R. 2021. Antibacterial and anticancer activity of ZnO with different morphologies: a comparative study. *3 Biotech*. 11(2): 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02611-9>
- Govorov, A.O. and Carmeli, I. 2007. Hybrid structures composed of photosynthetic system and metal nanoparticles: Plasmon enhancement effect. *Nano Letters*. 7(3): 620–625. <https://doi.org/10.1021/nl062528t>
- Gratton, S.E., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E. and DeSimone, J.M. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(33): 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Hajra, A. and Mondal, N.K. 2017. Effects of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germination, biochemical and morphoanatomical attributes of *Cicer arietinum* L. *Energy, Ecology and Environment*. 2(4): 277–288. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0059-6>
- Hänsch, R. and Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*. 12(3): 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- Upadhaya, H., Begum, L., Dey, B., Nath, P.K. and Panda, S.K. 2017. Impact of Calcium Phosphate Nanoparticles on Rice Plant. *Journal of Plant Science and Phytopathology*. 1(1): 001–010. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001001>
- Itrotwar, P.D., Kasivelu, G., Raguraman, V., Malaichamy, K. and Sevathapandian, S.K. 2020. Effects of biogenic zinc oxide nanoparticles on seed germination and seedling vigor of maize (*Zea mays*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 29: 101778. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101778>
- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortiz, H., Morales-Díaz, A.B., González-Morales, S., Morelos-Moreno, Á., Cabrera-De la Fuente, M., Sandoval-Rangel, A., Cadenas-Pliego, G. and Benavides-Mendoza, A. 2019. Nanoparticles and nanomaterials as plant biostimulants. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(1): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms20010162>
- Kamithi, K.D., Wachira, F. and Kibe, A. 2016. Effects of different priming methods and priming durations on enzyme activities in germinating chickpea (*Cicer arietinum* L.). *American Journal of Natural and Applied Sciences*. 1(1): 1–9.
- Khademalrasool, M., Farbod, M. and Talebzadeh, M.D. 2021. Investigation of shape effect of silver nanostructures and governing physical mechanisms on photo-activity: Zinc

- oxide/silver plasmonic photocatalyst. *Advanced Powder Technology*. 32(6): 1844–1857. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2021.03.008>
- Lawre, S., Laware, S.L. and Raskar, S. 2014. Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth, Flowering and Seed Productivity in Onion. *International Journal of Current Microbiology Science*. 3(7): 874–881. <http://www.ijcmas.com>
- Li, Y., Liang, L., Li, W., Ashraf, U., Ma, L., Tang, X., Pan, S., Tian, H. and Mo, Z. 2021. ZnO nanoparticle-based seed priming modulates early growth and enhances physio-biochemical and metabolic profiles of fragrant rice against cadmium toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*. 19(1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00820-9>
- Liu, M.Z., Zhang, S.Y., Sheng, Y.H. and Zhang, M.L. 2004. Selenium nanoparticles prepared from reverse microemulsion process. *Chinese Chemical Letters*. 15(10): 1249–1252.
- Liu, R. and Lal, R. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*. 514(2015): 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104>
- Mahajan, P., Dhoke, S.K., Kanna, A.S. and Tarafdar, J.C. 2011. Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research*. 13(2): 54–61.
- Mahakham, W., Sarmah, A.K., Maensiri, S. and Theerakulpisut, P. 2017. Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*. 7(1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>
- Mahdieh, M., Sangi, M.R., Bamdad, F. and Ghanem, A. 2018. Effect of seed and foliar application of nano-zinc oxide, zinc chelate, and zinc sulphate rates on yield and growth of pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*. 41(18): 2401–2412. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1510517>
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.T., Santoni, V., Shahzad, Z. and Verdoucq, L. 2015. Aquaporins in plants. *Physiological Reviews*. 95(4): 1321–1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>
- Méndez-López, A., González-García, Y. and Juárez-Maldonado, A. 2022. Stimulatory role of nanomaterials on agricultural crops. In *Nano-enabled Agrochemicals in Agriculture*. 219–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91009-5.00013-6>
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15(4): 523–530.
- Mokhtari, N., Daneshpajouh, S., Seyedbagheri, S., Atashdehghan, R., Abdi, K., Sarkar, S., Minaian, S., Shahverdi, H.R. and Shahverdi, A.R. 2009. Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. *Materials Research Bulletin*. 44(6): 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2008.11.021>
- Munir, T., Rizwan, M., Kashif, M., Shahzad, A., Ali, S., Amin, N., Zahid, R., Alam, M.F. and Imran, M. 2018. Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth and Zn uptake in wheat (*Triticum estivum* L.) by seed priming method. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 13(1): 315–323.
- Nagata, M. and Yamashita, I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon shokuhin kogyo gakkaiishi*. 39(10): 925–928.
- Nazerieh, H., Ardebili, Z.O. and Iranbakhsh, A. 2018. Potential benefits and toxicity of nanoselenium and nitric oxide in peppermint. *Acta Agriculturae Slovenica*. 111(2): 357–368. <https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.2.11>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311(5761): 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Ng, L.C., Sariah, M., Sariam, O., Radziah, O. and Abidin, M.A. 2012. Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic cultivation system. *Australian Journal of Crop Science*. 6(1): 170–175.
- Nguyen, D.T., Le, H.T., Nguyen, T.T., Nguyen, T.T.T., Bach, L.G., Nguyen, T.D. and Tran, T.D. 2021. Multifunctional ZnO nanoparticles bio-fabricated from *Canna indica* L. flowers for seed germination, adsorption, and photocatalytic degradation of organic dyes. *Journal of Hazardous Materials*. 420: 126586. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126586>
- Nounjan, N., Siangliw, J.L., Toojinda, T., Chadchawan, S. and Theerakulpisut, P. 2016. Salt-responsive mechanisms in chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Plant Physiology and Biochemistry*. 103: 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.038>
- Parisi, C., Vigani, M. and Rodríguez-Cerezo, E. 2015. Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities?. *Nano Today*. 10(2): 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.009>
- Park, J.H., Von, M.G., Zhang, L., Schwartz, M.P., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N. and Sailor, M.J. 2008. Magnetic iron oxide nanoworms for tumor targeting and imaging. *Advanced Materials*. 20(9): 1630–1635. <https://doi.org/10.1002/adma.200800004>
- Peng, X., Palma, S., Fisher, N.S. and Wong, S.S. 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*. 102(3–4): 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.014>
- Pérez-Velasco, E., Valdez-Aguilar, L.A., Betancourt-Galindo, R., Martínez-Juárez, J., Lozano-Morales, S.A. and González-Fuentes, J.A. 2021. Gas Exchange Parameters, Fruit Yield, Quality, and Nutrient Status in Tomato Are Stimulated by ZnO Nanoparticles of Modified Surface and Morphology and Their Application Form. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 21(2): 991–1003. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00416-0>
- Pokovai, K. and Fodor, N. 2019. Adjusting ceptometer data to improve leaf area index measurements. *Agronomy*. 9(12): 1–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120866>
- Prasad, T.N., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R. and Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*. 35(6): 905–927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Rai-Kalal, P. and Jajoo, A. 2021. Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*. 160: 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.032>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. and Job, D. 2012. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>

- Rundquist, D., Gitelson, A., Leavitt, B., Zygielbaum, A., Perk, R. and Keydan, G. 2014. Elements of an integrated phenotyping system for monitoring crop status at canopy level. *Agronomy*. 4(1): 108–123. <https://doi.org/10.3390/agronomy4010108>
- Hawkesford, M.J. and Barraclough, P.B. 2011. *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*. pp 512. Wiley, London. <https://doi.org/10.1002/9780470960707>
- Sau, T.K. and Rogach, A.L. 2010. Nonspherical noble metal nanoparticles: Colloid-chemical synthesis and morphology control. *Advanced Materials*. 22(16): 1781–1804. <https://doi.org/10.1002/adma.200901271>
- Sharifi, R. 2016. Effect of seed priming and foliar application with micronutrients on quality of forage corn (*Zea mays*). *Environmental and Experimental Biology*. 14(4): 151–156. <https://doi.org/10.22364/eeb.14.21>
- Shenashen, M.A., El-Safty, S.A. and Elshehy, E.A. 2014. Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications. *Particle and Particle Systems Characterization*. 31(3): 293–316. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300181>
- Singh, A., Prasad, S.M. and Singh, S. 2018. Impact of nano ZnO on metabolic attributes and fluorescence kinetics of rice seedlings. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*. 9: 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.11.006>
- Singh, R.P., Handa, R. and Manchanda, G. 2021. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. *Journal of Controlled Release*. 329: 1234–1248. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.051>
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*. 152–178.
- Steiner, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*. 15(2): 134–154.
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D. and Adam, V. 2018. Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of Hazardous Materials*. 349: 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>
- Syu, Y., Hung, J.H., Chen, J.C. and Chuang, H. 2014. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*. 83: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010>
- Rehman, U.H., Basra, S.M.A. and Farooq, M. 2011. Field appraisal of seed priming to improve the growth, yield, and quality of direct seeded rice. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 35(4): 357–367. <https://doi.org/10.3906/tar-1004-954>
- Wang, P. and Grimm, B. 2021. Connecting Chlorophyll Metabolism with Accumulation of the Photosynthetic Apparatus. *Trends in Plant Science*. 26(5): 484–495. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.005>
- Welch, R. 1982. Zinc in membrane function and its role in phosphorous toxicity. In 9th Conf. Commonwealth Agricultural Bureau, Colloquium, Warwick, England, (pp. 710–715).
- Xiu, Z.M., Zhang, Q.B., Puppala, H.L., Colvin, V.L. and Alvarez, P.J.J. 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*. 12(8): 4271–4275. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>
- Zafar, H., Ali, A., Ali, J.S., Haq, I.U. and Zia, M. 2016. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: Growth dynamics and antioxidative response. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00535>
- Zhao, J. and Stenzel, M.H. 2018. Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry*. 9(3): 259–272. <https://doi.org/10.1039/c7py01603d>
- Zhao, L., Su, Y., Hernandez-Viezcas, J.A., Servin, A.D., Hong, J., Niu, G., Peralta-Videa, J.R., Duarte-Garde, M., and Gardea-Torresdey, J.L. 2013. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: A Life Cycle Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(49): 11945–11951. <https://doi.org/10.1021/jf404328e>

Agronomic and metabolomic response of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings under the application of high indole-3-acetic acid concentrations

Respuesta agronómica y metabolómica de plántulas de melón (*Cucumis melo* L.) bajo la aplicación de altas concentraciones de ácido indol-3-acético

Oscar Sariñana-Aldaco^{1*}, Mariana Isabel Garcia-Terrazas¹, Pablo Preciado-Rangel², Óscar Silva-Marrufo³ and Eduardo Alberto Lara-Reimers^{4**}

¹ Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 25315, Coahuila, México; terrazas.mariana92@gmail.com

² Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Torreón, Torreón 27170, Coahuila, México; pablo.pr@torreon.tecnm.mx

³ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Durango 34371, Durango, México; oscar.sm@vguadiana.tecnm.mx

⁴ Departamento Forestal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 25315, Coahuila, México.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the foliar application of high concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) (0.0, 0.5, 1, 2 and 3 mM) on agronomic and metabolomic variables in melon seedlings, using a completely randomized design. The results indicate that the IAA at 0.5 mM improved the height by 20.98 %, and from 1 mM it decreased as the concentration increased. For total fresh and dry biomass, the control and the 0.5 mM concentration were the same, however, from 1 mM it decreased as the IAA concentration increased. For biomolecules, chlorophylls (*a* 25.60 %, *b* 51.31 % and total 32.50 %), flavonoids (13.13 %), antioxidant capacity (54.37 %) and proteins (26.38 %) increased as the IAA concentration increased. Ascorbic acid decreased with the application of IAA, and with 0.5, 1 and 2 mM the concentration of carotenoids increased by 11.76, 11.76 and 8.82 %, respectively, however, with 3 mM they began to decrease, but even so, they exceeded the control. From 1 mM of IAA, the agronomic characteristics of the seedlings began to decrease, therefore, it is advisable to apply concentrations lower than 0.5 mM to elucidate how they work.

Keywords: growth regulator; elicitor; signaling molecule; toxicity; metabolites.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la aplicación foliar de altas concentraciones de AIA (0.0, 0.5, 1, 2 y 3 mM) sobre variables agronómicas y metabolómicas en plántulas de melón, usando un diseño completamente al azar. Los resultados indican que el AIA a 0.5 mM mejoró la altura 20.98 %, y a partir de 1 mM disminuyó a medida que aumentaba la concentración. Para biomasa fresca y seca total, el control y la concentración de 0.5 mM fueron iguales, sin embargo, a partir de 1 mM la disminuyó a medida que aumentaba la concentración de AIA. Para biomoléculas, aumentaron clorofilas (*a* 25.60 %, *b* 51.31

% y total 32.50 %), flavonoides (13.13 %), capacidad antioxidante (54.37 %) y proteínas (26.38 %) a medida que aumenta la concentración de AIA. El ácido ascórbico disminuyó con la aplicación del AIA, y con 0.5, 1 y 2 mM incrementó la concentración de carotenoides en 11.76, 11.76 y 8.82 %, respectivamente, sin embargo, con 3 mM comenzaron a disminuir, pero, aun así, superaron al control. A partir de 1 mM de AIA comenzaron a disminuir las características agronómicas de las plántulas, por lo tanto, es recomendable aplicar concentraciones inferiores a 0.5 mM para dilucidar cómo funcionan. **Palabras clave:** regulador de crecimiento; elicitor; molécula de señalización; toxicidad; metabolitos.

INTRODUCTION

Phytohormones (auxins, cytokinins, gibberellins, ethylene, abscisic acid, salicylic acid, benzoic acid and jasmonic acid) are natural compounds produced by plants that define a large part of development (Nehela *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021). They are synthesized at very low concentrations under normal conditions and can act at the synthesis site or be translocated to other organs to regulate different physiological and biochemical elicitation or inhibition processes (Fahad *et al.*, 2015). In addition to this, they also function as signaling molecules, allowing plants to function during exposure to different types of stress (Rhaman *et al.*, 2020). Under stress, whether biotic (insects, fungi, bacteria or viruses) or abiotic (salinity, drought, extreme temperatures and heavy metals), plants increase the synthesis of phytohormones, in order to carry out the signaling process and defense response occurs (Fahad *et al.*, 2015; Ku *et al.*, 2018).

Each phytohormone synthesized by the plant fulfills different functions and can act alone or together regulating different processes (Aerts *et al.*, 2021). Auxins are the phytohormones of primary growth, be it root, stems, leaves, flowers and fruits (Chandra *et al.*, 2018). Indole-3-acetic acid

(IAA) is the most relevant auxin in terms of quantity and activity, which is synthesized from the aromatic amino acid tryptophan (Matilla, 2020). The synthesis is carried out in the apical meristems (apical buds), responsible for primary growth. For this reason, IAA controls processes such as cell division and elongation, participates in plant tropisms, acts in tissue differentiation, inhibits senescence, inhibits the sprouting of axillary buds (lateral meristems) and inhibits organ abscission (Chandra *et al.*, 2018). Zinc (Zn) and boron (B) are related to IAA since its deficiency causes a lower synthesis of the phytohormone, which affects the processes in which it intervenes (Khan *et al.*, 2022).

The IAA, when derived from a primary metabolite, turns into a secondary metabolite with important functions at the metabolomic level (Matilla, 2020). In this sense, metabolomics is one of the omic sciences that studies substances called metabolites, present in an organism, tissue or organ at a given stage of development and under particular environmental conditions (McLaughlin *et al.*, 2023).

The melon (*Cucumis melo* L.) is a crop of economic importance that is produced worldwide, this being a source of carotenoids, vitamins, phenolic compounds, sugars, and minerals (Manchali *et al.*, 2021). The main producing countries are China, Morocco and Spain (Mahmoodi *et al.*, 2020). Due to the importance that melon represents worldwide, it is important to produce quality seedlings. Obtaining quality seedlings depends on their genetics, physiology and the environment in which they develop (Sariñana-Aldaco *et al.*, 2021). Today their production is negatively affected by different environmental factors, which makes them prone to different infections by pathogens (Ruan *et al.*, 2009). Given this, there are promising alternatives such as the exogenous application of elicitors such as phytohormones that allow improving the growth, yield and quality of vegetables. Elicitors are substances that, when applied to plants in a preventive manner, help to avoid or reduce damage from biotic or abiotic stressors, which is reflected in improvements in agronomic characteristics and greater synthesis of antioxidants (Caicedo-López *et al.*, 2021).

The application of phytohormones in horticultural plants is a common practice, however, regarding the use of IAA, there are no specific data on the concentrations that can improve or harm their growth and development. In any case, for the application of these products, the concentration to be used, the environmental conditions and the biological model of study must be taken into account, since they are factors that influence the results (Montaño-Mata and Méndez-Natera, 2009; Caicedo-López *et al.*, 2021). In addition to this, there are precedents that indicate that melon is a vegetable susceptible to high concentrations of IAA (Montaño-Mata and Méndez-Natera, 2009).

As already mentioned, there is no specific data on the use of IAA in vegetables. For this reason, to obtain approximate data on the concentrations that cause toxicity, an experiment was established in which high concentrations were tested in melon seedlings to evaluate the impact at the

agronomic and metabolomic level. With this, the aim is to find the concentration with which the melon seedlings begin to become intoxicated, and from there, in subsequent experiments, try lower concentrations that allow us to improve the productivity.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and experimental conditions

Expedition hybrid melon seeds (Harris Moran®, USA) were sown in 0.5 L styrofoam containers with a mixture of peat moss and perlite substrate (1:1 v/v). The experiment was established in a greenhouse covered with polyethylene in the Horticulture Departamento of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University (Saltillo, Mexico). The average temperature was 29 °C and 50 to 60 % relative humidity.

The treatments applied were the following: IAA at four concentrations (0.5, 1, 2 and 3 mM) and an absolute control with deionized water, which were established based on the study by Vidyullatha and Topno (2022). The treatments were applied via the foliar route, a manual sprinkler was used, and the plants were sprayed to the point of dripping. The applications were every 10 days after the emergency, accumulating three applications during the experiment, which lasted 31 days. The applications were made between 6:00 p.m. and 7:00 p.m. Each IAA concentration was diluted in 10 mL of pure ethanol and subsequently made up to 500 mL with deionized water.

The irrigation system was manual, giving one irrigation per day at field capacity. The nutrition of the plants was carried out with the nutrient solution Steiner (1961) at 25 %.

Sampling and evaluations

Sampling and evaluation were carried out 24 h after the third application of the treatments (31 days after emergence). The sampling consisted of four seedlings per treatment to determine the concentration of different biomolecules. The sampling was carried out by removing all the leaves of the seedlings and freezing them with liquid nitrogen and then storing them in a deep freezer at -80 °C. The evaluations consisted of four seedlings per treatment that were chosen to measure height, leaf area, stem diameter and fresh and dry biomass.

Height and stem diameter were measured with a flexometer, and their results were expressed in cm and mm, respectively. Leaf area was measured using the AccuPAR model Lp-80 PAR/LAI ceptometer (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA), and its results were expressed in cm². The fresh and dry biomass was quantified with the help of a digital scale, and its results were reported in g and mg, respectively.

Biochemical analysis

For the determinations of the biomolecules in the leaves of the melon seedlings, the frozen tissue was lyophilized (Labconco Freezone 2.5 Plus Liter Freeze Dry System Model 7670021 Date 5-17-12new) and macerated to later carry out the extractions and quantifications according to the methodologies used.

The concentrations of foliar pigments were determined according to what was described by Wellburn (1994). For this, 15 mg of lyophilized tissue were mixed with 1.250 mL of 100 % methanol. The mixture was incubated for 24 h in the dark and the absorbance of the supernatant was evaluated in a ultraviolet-visible (Uv-Vis) spectrophotometer (Genesis 10s Uv-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 666, 653 and 470 nm. The pigments concentration was expressed in milligrams per gram of dry weight (mg g^{-1} DW), using the following formulas:

$$\text{Chlorophyll } a = [15.65(\text{abs}666) - 7.34(\text{abs}653)] \quad (1)$$

$$\text{Chlorophyll } b = [27.05(\text{abs}653) - 11.21(\text{abs}666)] \quad (2)$$

$$\text{Total chlorophyll} = \text{chlorophyll } a + \text{chlorophyll } b \quad (3)$$

$$\text{Carotenoids} = \frac{[(1000\text{abs}470) - 2.86(\text{chlorophyll } a) - 129.2(\text{chlorophyll } b)]}{221} \quad (4)$$

The extraction of soluble proteins and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) antioxidant capacity, 100 mg of lyophilized tissue were placed in a 2 mL tube and 2 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7-7.2) were added. Then the mixture was homogenized with a vortexed for 20 s, sonicated for 5 min, and centrifuged at 12,500 rpm at 4 °C for 10 min. Finally, the supernatant was collected for analysis.

The soluble protein content was determined by the Bradford method (1976). In 2 mL tubes, 100 μL of the supernatant and 1 mL of Bradford reagent were added. Subsequently, it was left to rest for 5 min and the reading was taken in a Uv-Vis spectrophotometer at 595 nm. The results were reported in milligrams per gram of dry weight (mg g^{-1} DW).

The antioxidant capacity was determined by the method described by Re *et al.* (1999), which is based on the bleaching of the ABTS radical. The radical was obtained from the ratio of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (1:1 v/v) in the dark for 16 h, then diluted with 20 % ethanol until obtaining an absorbance of 0.7 at 754 nm. For quantification, 20 μL of the extract and 980 μL of the radical dilution were added to a 2 mL tube. Subsequently, the mixtures were shaken for 5 s and left to rest for 7 min in the dark. The reading was immediately carried out in a Uv-Vis spectrophotometer at 754 nm. The results were expressed in equivalents milligrams of ascorbic acid per gram of dry weight (mg AAE g^{-1} DW).

Total phenols were quantified by the method described by Singleton *et al.* (1999). The sample was extracted by placing 100 mg of lyophilized tissue in a 2 mL tube and adding 2 mL of extraction solution (water: acetone 1:1 v/v). The mixture was vortexed for 20 s, then sonicated for 5 min. Finally, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C to obtain the supernatant and proceed to quantification. Quantification was performed in test tubes by adding 50 μL of the supernatant, 0.2 mL of 100 % Folin Ciocalteu reagent, 0.5 mL of 20 % Na_2CO_3 , and 5 mL of distilled water. The mix-

ture was allowed to settle for 30 min at 45 °C. Subsequently, the mixture was read at a wavelength of 750 nm in a Uv-Vis spectrophotometer. The results of phenols were expressed in equivalents milligrams of gallic acid per gram of dry weight (mg GAE g^{-1} DW).

The flavonoids were quantified following the methodology of Zhishen *et al.* (1999). Compounds were extracted by placing 100 mg of lyophilized tissue in 2 mL tubes and adding 2 mL of 100 % methanol. The mixture was homogenized by vortexing for 20 s, then sonicated for 5 min, and centrifuged at 4,000 rpm for 10 min at 4 °C to obtain the supernatant. For quantification, 250 μL of the supernatant were added to a test tube, followed by the addition of 75 μL of 5 % NaNO_2 and vortexed. After 5 min, 150 μL of 10 % AlCl_3 were added; immediately, 0.5 mL of 1 M NaOH were added, plus 2.025 mL of distilled water. Finally, the absorbance at 510 nm was measured in a Uv-Vis spectrophotometer. The results were reported in equivalents milligrams of catechin per gram of dry weight (mg CE g^{-1} DW).

Ascorbic acid was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) with Uv detector (HPLC VARIAN 920LC), using the method of Nour *et al.* (2010). The extraction was similar to that of flavonoids. The obtained supernatant was filtered through 0.45 μm pore diameter membranes and transferred to vials for injection into the chromatograph. The mobile phases were 50 mM NaH_2PO_4 with a pH of 2.8 (Phase A) and 100 % acetonitrile (Phase B), with a ratio of 80:20, flow rate of 1.0 mL min^{-1} , and the column used was aquasil C-18 at 60 °C. The injection volume was 50 μL . Detection of the molecule was performed at 230 nm. Results were reported in milligrams per hundred grams of dry weight ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ DW).

Experimental design and data analysis

A completely randomized design was used, considering eight replicates per treatment (four for biomolecule analysis and four for agronomic variables). An analysis of variance and Fisher's LSD test of means ($p \leq 0.05$) were performed. A Pearson correlation analysis was also performed between the agronomic variables and the biomolecules evaluated. Statistical procedures were performed using Infostat software (v2020) and GraphPad Prism 8 statistical software.

RESULTS

Seedling growth and biomass

The results show that the foliar application of IAA significantly affected the growth (Table 1) and biomass (Figure 1) of the melon seedlings. For height, the concentration of 0.5 mM IAA exceeded the control by 20.98 %, and the rest of the treatments were the same as the control. There were no statistically significant differences in stem diameter and leaf area.

Regarding fresh aerial biomass, it can be seen that the control and the 0.5 mM IAA concentration are statistically the same, however, the 1 mM concentration began to decrease as the IAA concentration increased, where the 3 mM treatment

Table 1. Effect of IAA on the growth of melon seedlings.
Tabla 1. Efecto de AIA en el crecimiento de plántulas de melón.

IAA (mM)	Height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf area (cm ²)
AbC	6.67 ± 0.57 bc	0.48 ± 0.02 ab	16.47 ± 0.23 a
0.5	8.07 ± 0.15 a	0.52 ± 0.02 a	18.46 ± 0.86 a
1	7.23 ± 1.00 ab	0.50 ± 0.005 ab	17.84 ± 1.99 a
2	5.93 ± 0.75 c	0.47 ± 0.02 ab	15.70 ± 2.53 a
3	5.73 ± 0.20 c	0.46 ± 0.03 b	15.68 ± 2.18 a
CV (%)	9.35	5.80	10.62

Different letters within each column indicate significant difference between treatments (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm standard deviation (SD). AbC: absolute control; CV: coefficient of variation.

Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm desviación estándar (SD). AbC: control absoluto; CV: coeficiente de variación.

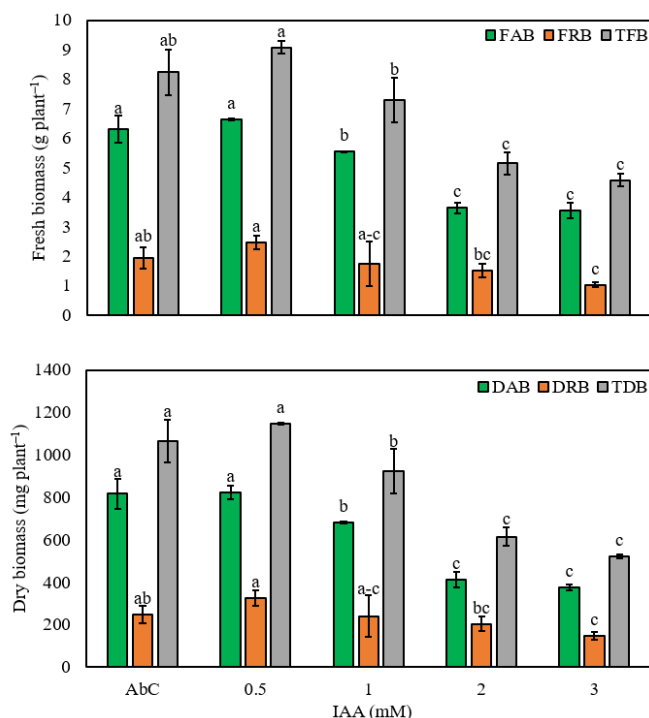


Figure 1. Effect of IAA on biomass accumulation in melon seedlings. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm SD. FAB: fresh aerial biomass; FRB: fresh root biomass; TFB: total fresh biomass; DAB: dry aerial biomass; DRB: dry root biomass; TDB: total dry biomass; AbC: absolute control.

Figura 1. Efecto de AIA en la acumulación de biomasa en plántulas de melón. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.05$) $n = 4$; \pm SD. FAB: biomasa aérea fresca; FRB: biomasa de raíz fresca; TFB: biomasa fresca total; DAB: biomasa aérea seca; DRB: biomasa de raíz seca; TDB: biomasa seca total; AbC: control absoluto.

was outperformed by the control by 77.46 %. Regarding the fresh root biomass, the treatments of 0.5, 1 and 2 mM of IAA were equal to the control, and the 3 mM showed an inferiority of 93.20 %, compared to the control. Regarding the total fresh biomass, the 0.5 and 1 mM IAA treatments were equal to the control, and the 2 and 3 mM were 60.31 and 79.91 % lower, respectively.

In aerial dry biomass, the control and the 0.5 mM IAA treatment were the same, and from the 1 mM it began to decline, with the 3 mM showing the least amount, being surpassed by the control in a 117.38 %. Root dry biomass was only negatively affected by the 3 mM IAA concentration, being 69.34 % minor than the control. The rest of the treatments were statistically equal to the control. In total dry biomass, the control and the 0.5 mM IAA treatment were the same, and decreasing considerably from the 1mM, where the 3 mM concentration of was the most affected as it was surpassed by the control by 103.92 %.

Foliar pigments of melon seedlings

The concentration of chlorophylls and carotenoids was affected by the different treatments applied (Figure 2).

In chlorophyll *a*, all the IAA treatments statistically outperformed the control, being the 3 mM the one that showed the best results, surpassing it by 25.60 %. For chlorophyll *b*, in the same way, all the concentrations with IAA surpassed the control, being the one with 3 mM the best, surpassing it by 51.31 %.

In total chlorophyll, all the concentrations with IAA surpassed the control, where once again the 3 mM was the one that showed the best results, surpassing it by 32.50 %. Regarding carotenoids, it can be seen that the 0.5, 1, and 2 mM IAA treatments were the best, surpassing the control by 11.76, 11.76, and 8.82 %, respectively. The 3 mM IAA concentration was statistically superior to the control, but inferior to the rest of the treatments.

Antioxidants, antioxidant capacity, and proteins of melon seedlings leaves

The results for these biochemical variables were highly varied (Figure 3). It can be seen that the IAA caused a decrease in ascorbic acid in all its concentrations, compared to the control. For total phenols there were no significant differences.

In flavonoids, it is observed that they increased as the IAA concentration increased, with the 3 mM showing the best results, exceeding the control by 13.13 %. Regarding antioxidant capacity, the 2 and 3 mM IAA treatments were the best, surpassing the control by 54.37 and 38.21 %, respectively. In soluble proteins, it can be seen that the 2 and 3 mM IAA concentrations were superior to the control, exceeding it by 24.86 and 26.38 %, respectively.

Correlation analysis

A Pearson correlation analysis was performed for agronomic and biochemical variables (Figure 4). In the agronomic variables it is observed that there is a positive correlation between total fresh biomass, dry aerial biomass and total dry biomass with fresh aerial biomass. There was also a positive correlation between aerial dry biomass and total dry biomass with total fresh biomass. Total dry biomass was positively correlated with aerial dry biomass.

Figure 2. Effect of IAA on the concentration of foliar pigments in melon seedlings. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm SD. Chl *a*: chlorophyll *a*; Chl *b*: chlorophyll *b*; Chl *T*: total chlorophyll; DW: dry weight; AbC: absolute control.

Figura 2. Efecto del AIA en la concentración de pigmentos foliares en plántulas de melón. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm SD. Chl *a*: clorofila *a*; Chl *b*: clorofila *b*; Chl *T*: clorofila total; DW: peso seco; AbC: control absoluto.

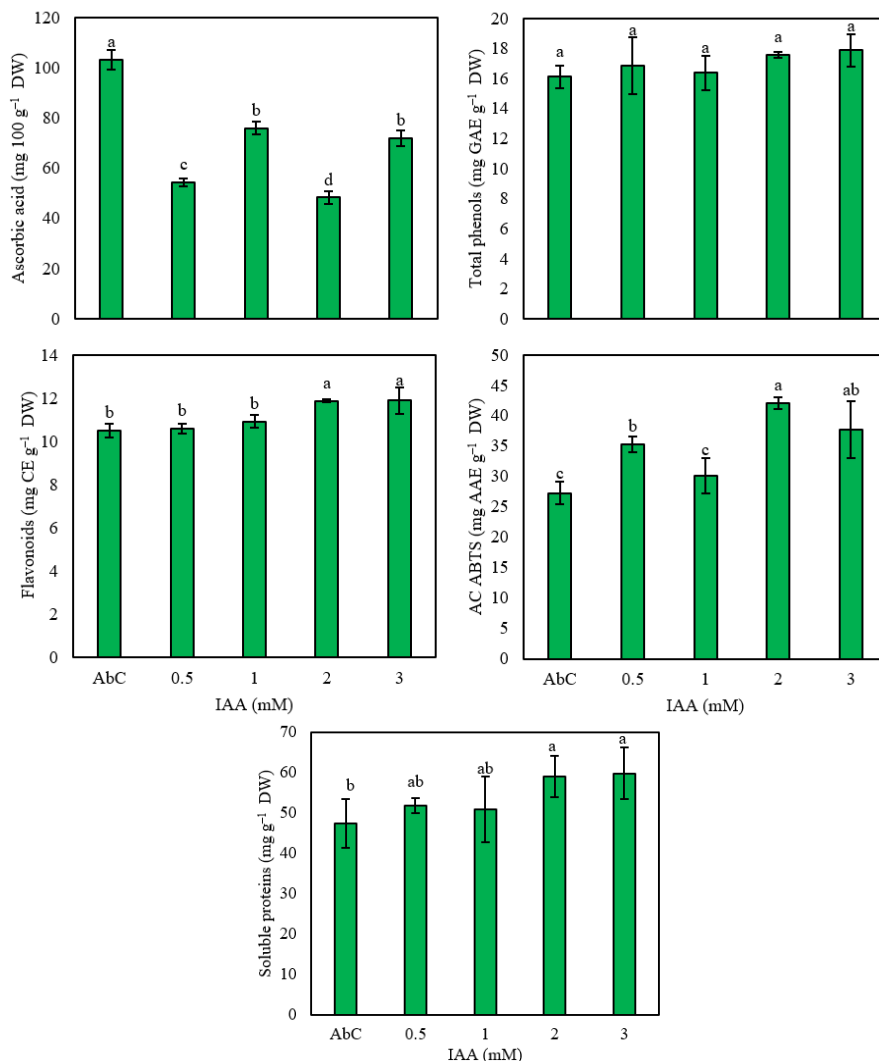
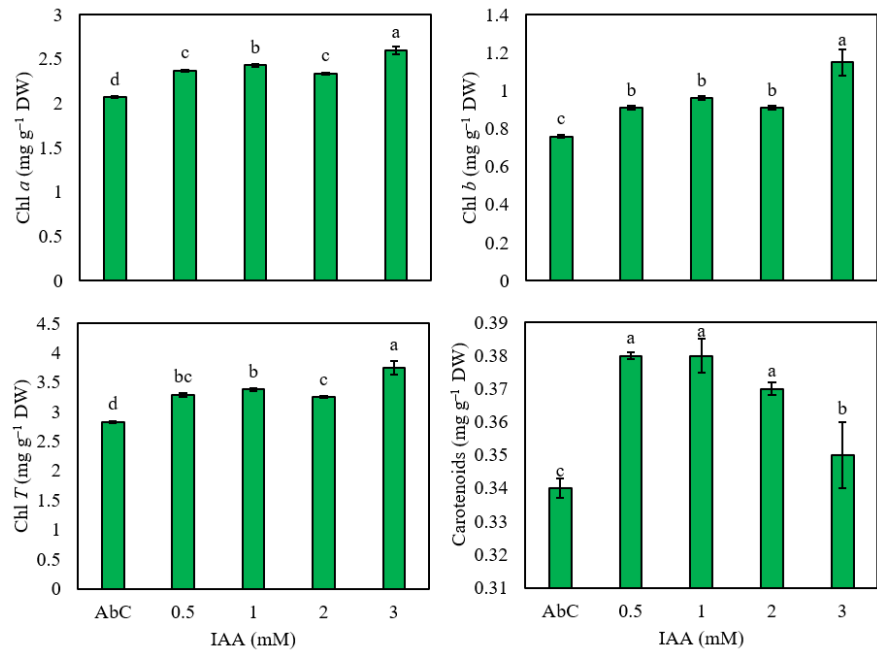


Figure 3. Effect of IAA on the concentration of antioxidants, antioxidant capacity, and proteins in the leaves of melon seedlings. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm SD. DW: dry weight; GAE: gallic acid equivalents; CE: catechin equivalents; AAE: ascorbic acid equivalents; AC: antioxidant capacity; AbC: absolute control.

Figura 3. Efecto del AIA en la concentración de antioxidantes, capacidad antioxidante y proteínas en las hojas de plántulas de melón. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.05$). $n = 4$; \pm SD. DW: peso seco; GAE: equivalentes de ácido gálico; CE: equivalentes de catequina; AAE: equivalentes de ácido ascórbico; AC: capacidad antioxidante; AbC: control absoluto.

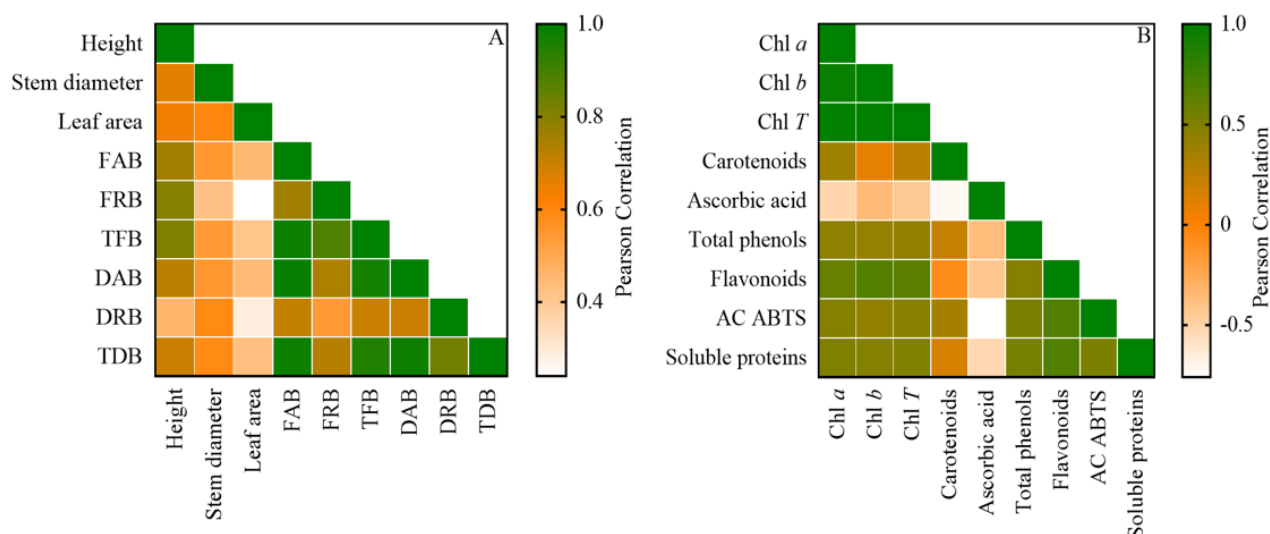


Figure 4. Pearson correlation matrix of agronomic (growth and biomass) (A) and biochemical (B) variables determined in leaves of melon seedlings treated with IAA. FAB: fresh aerial biomass; FRB: fresh root biomass; TFB: total fresh biomass; DAB: dry aerial biomass; DRB: dry root biomass; TDB: total dry biomass; Chl *a*: chlorophyll *a*; Chl *b*: chlorophyll *b*; Chl *T*: total chlorophyll; AC: antioxidant capacity.

Figura 4. Matriz de correlación de Pearson de variables agronómicas (crecimiento y biomasa) (A) y bioquímicas (B) determinadas en hojas de plántulas de melón tratadas con AIA. FAB: biomasa aérea fresca; FRB: biomasa de raíz fresca; TFB: biomasa fresca total; DAB: biomasa aérea seca; DRB: biomasa de raíz seca; TDB: biomasa seca total; Chl *a*: clorofila *a*; Chl *b*: clorofila *b*; Chl *T*: clorofila total; AC: capacidad antioxidante.

Regarding the biochemical variables, it can be seen that chlorophyll *b* and total were positively correlated with chlorophyll *a*. Total chlorophyll was also positively correlated with chlorophyll *b*. Flavonoids were positively correlated with chlorophyll *a*, *b* and total. Antioxidant capacity and soluble proteins were also positively correlated with flavonoids. Ascorbic acid showed a negative correlation with the rest of the biomolecules.

DISCUSSION

Seedling growth and biomass

The production of quality seedlings depends on different factors (genetics, physiology and conditions for shoot and root development) (Giménez *et al.*, 2008). However, in recent years the production of seedlings is affected by biotic and abiotic factors that negatively impact their quality (Ruan *et al.*, 2009). These situations have been key in the development of different techniques that allow the best production of seedlings, which allows obtaining more profitable and quality productions. One of the techniques used is the use of elicitors such as phytohormones, which when applied to plants activate their metabolism and make them more resistant to subsequent factors that generate stress (Sariñana-Aldaco *et al.*, 2020; Meena *et al.*, 2022).

The results obtained for growth variables indicate that only in height there were significant differences with the concentration of 0.5 mM of IAA, which is possible thanks to the fact that IAA is involved in the primary growth of plants and its synthesis occurs mainly in the apical meristems (apical buds) (Salehi *et al.*, 2014). From the 1 mM concentration, the height began to decrease, possibly due to the toxicity generated by the high concentrations of IAA applied. It is believed that in the variables of stem diameter and leaf area

there were no differences because IAA is involved in primary growth and inhibits the development of lateral meristems that are in charge of secondary growth (Chandra *et al.*, 2018).

Regarding the biomass, the concentration of 0.5 mM of IAA and the control were the same, and from the concentration of 1 mM it began to decline. This tells us about a possible intoxication by the IAA. When these types of substances are applied to elicit plants, it is very important to take into account different factors such as the biological study model, environmental conditions, and the concentrations of the elicitor to be used, since these elicitors show favorable results at low concentrations (Montaño-Mata and Méndez-Natera, 2009). Due to this, when these types of substances are used, it is advisable to review the literature on their use, and in the event that there is little existing information, it is recommended to carry out preliminary tests that allow obtaining information on the concentrations that improve the agronomic characteristics of the crops or in the case of this study of the concentrations that cause toxicity.

Similar results are reported by Gil-Rivero *et al.* (2016), who indicate that the lowest concentration of IAA (0.5 mg L⁻¹) was optimal in the *in vitro* propagation of papaya, and as the concentration rose, toxicity symptoms were observed which negatively affected the propagation. In the same way, Montaño-Mata and Méndez-Natera (2009), mentioned that the yield of melon fruits was negatively affected as the IAA concentration rose up to 200 mg L⁻¹.

When an appropriate threshold for the organism is exceeded, negative responses are generated called toxicity (when it comes to biochemical compounds) or inhibition (physical factors such as temperature or irradiance) (Juárez-Maldonado *et al.*, 2021). In the case of this study, for the height and biomass variables, toxicity was generated (from 1 mM of IAA), because IAA is a biochemical compound.

Foliar pigments of melon seedlings

The chlorophylls are one of the most important pigments that plants have, this because they control photosynthetic activity and are important in the production of photoassimilates (Zepka *et al.*, 2019). In addition to this, plants also have accessory pigments such as carotenoids, which have photoprotective properties, and capture light in regions that are not covered by chlorophylls, which improves photosynthetic activity (Collini, 2019).

The results of the present investigation indicate that as the concentration of IAA in the seedlings increased, the concentration of chlorophylls increased. In carotenoids, all the treatments with IAA increased their concentration, compared to the control. However, with the concentration of 3 mM the carotenoids began to decrease. Li *et al.* (2020) mentioned that the application of IAA (30 and 60 mg L⁻¹) in *Cyphomandra betacea* seedlings increased the concentration of chlorophylls and carotenoids. However, by increasing the IAA concentration (90 and 120 mg L⁻¹), the concentration of the pigments began to decrease significantly.

The results obtained are the product of the IAA applications, since it is involved in the synthesis of pigments and in the accumulation of sugars such as glucose and fructose (Huan *et al.*, 2021). All this is related to improvements in photosynthetic activity, however, applying high concentrations to plants can cause pigment oxidation as observed in carotenoids, which decreased significantly from 3 mM IAA concentration, compared to with the rest of the IAA treatments. This situation also helped to prevent oxidation of chlorophylls, as carotenoids are pigments involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS), where they tend to oxidize and thus protect chlorophylls to some extent, which is believed to have occurred in this study (Collini, 2019).

Antioxidants, antioxidant capacity, and proteins of melon seedling leaves

Antioxidants are compounds synthesized by plants in their different organs, characterized by delaying or preventing oxidative damage to other molecules, this by reducing ROS produced during stress (Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

The results of the present investigation show that flavonoids and antioxidant capacity were elevated with the highest IAA concentrations. Flavonoids are secondary metabolites responsible for the coloration of flowers, fruits and leaves. They are involved in pollination by attracting insects and have a photoprotective and antioxidant effect (Ferreira *et al.*, 2021). Gangwar *et al.* (2011) mentioned that the application of IAA at 10 µM in pea seedlings increased the concentration of reduced glutathione; important antioxidant in the defense system of plants. Possibly, this is because IAA at high concentrations can cause toxicity and consequently the production of ROS, which promote the synthesis of different antioxidants (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). In this way, Wang *et al.* (2022) mentioned that flavonoids can act as auxin transport inhibitors in high concentrations, which indicates

that the higher the concentration of IAA in plants, the greater the accumulation of flavonoids.

Enzymes are proteins that are involved in different processes such as the antioxidant system, and in this study, it can be seen that increasing the IAA concentration increased the proteins, which may be related to the greater antioxidant capacity. Gong *et al.* (2019) indicated that in spinach seedlings, the activity of the superoxide dismutase enzyme was improved as the IAA concentration increased. It is very common that when some metabolite is found in excess, plants try to mitigate the stress that can be caused, and they do this by metabolizing it to a certain degree (Godoy *et al.*, 2021). This may be a clear example of IAA, where in order to enter it into plant metabolism, specific transporters are required, which are proteins, which in this case is believed to be another explanation for the increase in proteins (Wang *et al.*, 2022).

In the study it is also observed that the IAA applications decreased the concentration of ascorbic acid, in comparison to the control. The IAA has the ability to transform peroxidase enzymes in highly specific oxygenases that generate ROS, with oxidizing power, and one of the most important peroxidases in the antioxidant system of plants is ascorbate peroxidase, which is affected by IAA and does not fulfill its antioxidant function, but instead oxidizes ascorbic acid with the ROS produced (Rogozhin and Rogozhina, 2004).

Correlation analysis

The analysis of the agronomic variables showed a positive correlation between the variables of fresh biomass and dry biomass, which is evident when the conditions in which the experiment is carried out are homogeneous, being the case of this experiment. When conditions are heterogeneous, dry biomass is more accurate than fresh biomass to provide information on crop yield and productivity (González-Aguilar *et al.*, 2018).

Regarding the biochemical variables, chlorophyll *a* and *b* showed a positive correlation. This because chlorophyll *a* is the main pigment of photosynthesis, traps light energy and emits high-energy electrons in the two photosystems, and in terms of chlorophyll *b* is the accessory pigment, which passes the trapped energy to chlorophyll *a* (Zepka *et al.*, 2019). Flavonoids showed a positive correlation with chlorophylls, and this is possible thanks to the fact that flavonoids protect the photosynthetic apparatus from ultraviolet radiation (Zhou *et al.*, 2016).

The antioxidant capacity and the proteins showed a positive correlation with the flavonoids, and this is due to the existing relationship in the defense system. Flavonoids are a very broad group of antioxidants, and some proteins such as enzymes, have high antioxidant power (Zhou *et al.*, 2016; Leija-Martínez *et al.*, 2018).

The IAA caused the oxidation of ascorbic acid and the increase of the rest of the biomolecules, thus explaining the negative correlation (Rogozhin and Rogozhina, 2004; Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

The results indicated that the use of IAA modified the agronomic and biochemical variables of the melon seedlings. It is concluded that the concentration of 0.5 mM of IAA is adequate to improve the agronomic characteristics of melon seedlings. In addition to this, it also improved the synthesis of chlorophyll *a*, *b*, total, carotenoids and antioxidant capacity, compared to the control. For this reason, it is advisable to handle IAA concentrations below 0.5 mM, which will possibly promote the production of vigorous seedlings, with improved photosynthetic activity and a better defense system. Otherwise, if concentrations higher than 0.5 mM of IAA are handled, the quality of the seedlings will decrease (less vigor), as observed in the present study.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are not conflicts of interest related to this article.

REFERENCES

- Aaerts, N., Pereira Mendes, M. and Van Wees, S.C. 2021. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *The Plant Journal*. 105: 489-504. <https://doi.org/10.1111/tpj.15124>
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Caicedo-López, L.H., Aranda, A.L.V., Gómez, C.E.Z., Márquez, E.E. and Zepeda, H.R. 2021. Elicitors: Bioethical implications for agriculture and human health. *Revista Bioética*. 29: 76-86. <https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448>
- Chandra, S., Askari, K. and Kumari, M. 2018. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16: 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>
- Collini, E. 2019. Carotenoids in photosynthesis: the revenge of the "accessory" pigments. *Chem*. 5: 494-495. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.02.013>
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F.A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M.R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N. and Huang, J. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*. 75: 391-404. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0013-y>
- Ferreira, M.L.F., Serra, P. and Casati, P. 2021. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*. 173: 736-749. <https://doi.org/10.1111/ppl.13543>
- Gangwar, S., Singh, V.P., Prasad, S.M. and Maurya, J.N. 2011. Differential responses of pea seedlings to indole acetic acid under manganese toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33: 451-462. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0565-z>
- Giménez, G., Andriolo, J.L., Janisch, D. and Godoi, R. 2008. Closed soilless growing system for producing strawberry bare root transplants and runner tips. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43: 1757-1761. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008001200016>
- Gil-Rivero, A.E., López-Medina, E. and López-Zavaleta, A. 2016. Efecto sinérgico del ácido indolacético, ácido giberélico y 6-bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de "papaya" *Carica papaya* L. (Caricaceae). *Arnaldoa*. 23: 577-586. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.232.23210>
- Godoy, F., Olivos-Hernández, K., Stange, C. and Handford, M. 2021. Abiotic stress in crop species: improving tolerance by applying plant metabolites. *Plants*. 10: 186. <https://doi.org/10.3390/plants10020186>
- Gong, Q., Li, Z., Wang, L., Dai, T., Kang, Q. and Niu, D. 2019. Exogenous of indole-3-acetic acid application alleviates copper toxicity in spinach seedlings by enhancing antioxidant systems and nitrogen metabolism. *Toxics*. 8: 1. <https://doi.org/10.3390/toxics8010001>
- González-Aguilar, D., Álvarez-Hernández, U. and Lima-Orozco, R. 2018. Acumulación de biomasa fresca y materia seca por planta en el cultivo intercalado caupí-sorgo. *Centro Agrícola*. 45: 77-82.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud J.A., Fujita, M. and Fotopoulos, V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 9: 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Huan, Y., Yang, L., Liu, Q., Lin, L., Liao, M., Wang, Z., Liang, D., Xia, H., Tang, Y., Lv, X. and Wang, J. 2021. Effects of indole acetic acid on the growth and selenium absorption characteristics of *Cyphomandra betacea* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 43: 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03247-9>
- Juárez-Maldonado, A., Tortella, G., Rubilar, O., Fincheira, P. and Benavides-Mendoza, A. 2021. Biostimulation and toxicity: The magnitude of the impact of nanomaterials in microorganisms and plants. *Journal of Advanced Research*. 31: 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.12.011>
- Khan, M.M.H., Ahmed, N., Naqvi, S.A.H., Ahmad, B., Dawar, K., Rahi, A.A., Shoaib, S., Datta, R., Fahad, S., Syed, A., Bahkali, A.H. and Danish, S. 2022. Synchronization of zinc and boron application methods and rates for improving the quality and yield attributes of *Mangifera indica* L. on sustainable basis. *Journal of King Saud University-Science*. 34: 102280. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102280>
- Ku, Y.S., Sintaha, M., Cheung, M.Y. and Lam, H.M. 2018. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 3206. <https://doi.org/10.3390/ijms19103206>
- Leija-Martínez, P., Benavides-Mendoza, A., Cabrera-De La Fuente, M., Robledo-Olivo, A., Ortega-Ortiz, H., Sandoval-Rangel, A. and González-Morales, S. 2018. Lettuce biofortification with selenium in chitosan-polyacrylic acid complexes. *Agronomy*. 8: 275. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120275>
- Li, Z., Zhu, J., Wang, Y., Lin, L., Liao, M.A., Wang, J., Deng, Q., Tang, Y., Wang, X. and Wang, J. 2020. Effects of exogenous indole acetic acid on growth and cadmium accumulation of *Cyphomandra betacea* seedlings. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 102: 771-779. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1726336>

- Mahmoodi, A., Yavari, G. and Kalwandy, R. 2020. Investigating Iran's Situation in the melons and cantaloupe World Market & Screening of business partners. Iranian Journal of Agricultural Economics and Development Research. 51(2): 295-312. <https://doi.org/668731.277871.2019.ijaedr/22059.10>
- Manchali, S., Chidambara Murthy, K.N. and Patil, B.S. 2021. Nutritional composition and health benefits of various botanical types of melon (*Cucumis melo* L.). Plants. 10: 1755. <https://doi.org/10.3390/plants10091755>
- Matilla, A.J. 2020. Auxin: Hormonal signal required for seed development and dormancy. Plants. 9: 705. <https://doi.org/10.3390/plants9060705>
- McLaughlin, S., Zhalnina, K., Kosina, S., Northen, T.R. and Sasse, J. 2023. The core metabolome and root exudation dynamics of three phylogenetically distinct plant species. Nature Communications. 14: 1649. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37164-x>
- Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P. and Marwal, A. 2022. Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. Plant Stress. 5: 100103. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100103>
- Montaño-Mata, N.J.M. and Méndez-Natera, J.R.M. 2009. Efecto del ácido indol acético y ácido naftaleno acético sobre el rendimiento en melón (*Cucumis melo* L.). Revista Científica UDO Agrícola. 9: 793-801.
- Nehela, Y., Taha, N.A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Amin, M.A., Ahmed, M.E. and El-Nagar, A. 2021. Benzoic acid and its hydroxylated derivatives suppress early blight of tomato (*Alternaria solani*) via the induction of salicylic acid biosynthesis and enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense machinery. Journal of Fungi. 7(8): 663. <https://doi.org/10.3390/jof7080663>
- Nour, V., Trandafir, I. and Ionica, M.E. 2010. HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. Notulae Botanicae, Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca. 38: 44-48. <https://doi.org/10.15835/nbha3814569>
- Rhaman, M.S., Imran, S., Rauf, F., Khatun, M., Baskin, C.C., Murata, Y. and Hasanuzzaman, M. 2020. Seed priming with phytohormones: An effective approach for the mitigation of abiotic stress. Plants. 10: 37. <https://doi.org/10.3390/plants10010037>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26: 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rogozhin, V.V. and Rogozhina, T.V. 2004. The role of indole-3-acetic acid in peroxidase oxidation of ascorbic acid catalyzed by horseradish peroxidase. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences. 31: 342-345. <https://doi.org/10.1023/B:BIBU.0000036937.82324.36>
- Ruan, J., Yoon, C., Yeoung, Y., Larson, K.D. and Ponce, L. 2009. Efficacy of highland production of strawberry transplants. African Journal of Biotechnology. 8: 1497-1501.
- Salehi, M., Hosseini, B. and Jabbarzadeh, Z. 2014. High-frequency in vitro plantlet regeneration from apical bud as a novel explant of *Carum copticum* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 4: S424-S428. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C529>
- Sariñana-Aldaco, O., Sánchez-Chávez, E., Troyo-Diéguez, E., Tapia-Vargas, L.M., Díaz-Pérez, J.C. and Preciado-Rangel, P. 2020. Foliar aspersion of salicylic acid improves nutraceutical quality and fruit yield in Tomato. Agriculture. 10: 482. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100482>
- Sariñana-Aldaco, O., Benavides-Mendoza, A., Juárez-Maldonado, A., Robledo-Olivo, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Preciado-Rangel, P. and González-Morales, S. 2021. Effect of extracts of *Sargassum* spp. in growth and antioxidants of tomato seedlings. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 8: e2814. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2814>
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Methods in Enzymology. 299: 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Steiner, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant and Soil. 15: 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Vidyullatha, L.M.M. and Topno, S.E. 2022. Effect of Naphthalene Acetic Acid & Indole Acetic Acid on Growth, Yield and Quality of Muskmelon (*Cucumis melo* L.). International Journal of Plant & Soil Science. 34: 1460-1469. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2022/v34i2231519>
- Wang, S., Sun, G., Luo, Y., Qian, W., Fan, K., Ding, Z. and Hu, J. 2022. Role of IAA and Primary Metabolites in Two Rounds of Adventitious Root Formation in Softwood Cuttings of *Camellia sinensis* (L.). Agronomy. 12: 2486. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102486>
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology. 144: 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E. and Roca, M. 2019. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. Current Opinion in Food Science. 26: 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>
- Zhao, B., Liu, Q., Wang, B. and Yuan, F. 2021. Roles of phytohormones and their signaling pathways in leaf development and stress responses. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 69: 3566-3584. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07908>
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry. 64: 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhou, R., Su, W.H., Zhang, G.F., Zhang, Y.N. and Guo, X.R. 2016. Relationship between flavonoids and photoprotection in shade-developed *Erigeron breviscapus* transferred to sunlight. Photosynthetica. 54: 201-209. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0074-4>



Isolation and identification of yeasts from the microbiota associated with lignocellulose degradation of *Euryphia cordifolia* (Palo podrido) with cellulolytic, xylanolytic, and laccase enzymatic activity

Aislamiento e identificación de levaduras de la microbiota asociadas a la degradación lignocelulósica de *Euryphia cordifolia* (Palo podrido) con actividad enzimática celulolítica, xilanolítica y lacasa

Juan Carlos Villalobos-Rocha¹; Miguel Angel Anducho-Reyes²; Yuridia Mercado-Flores²; Alejandro Téllez-Jurado^{2*}

¹ Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Casco de Santo Tomás, C.P. 11340, Miguel Hidalgo, Cd. de México, México.

² Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca-Cd. Sahagún km. 20, ExHacienda de Santa Bárbara, C.P. 43830, Zempoala, Hidalgo, México.

ABSTRACT

This study aimed to isolate yeasts strains from the microbiota associated with the degradation of lignocellulose from *Eucryphia cordifolia*, known as "Palo podrido", with cellulolytic, xylanolytic, and laccase capacity. Ten yeasts were isolated and identified by sequencing the ITS (Internal Transcribed Spacer) regions. Three basidiomycete yeasts and seven ascomycete yeasts were identified. All of the strains assimilated glucose and xylose, but none could assimilate starch. Three strains showed fermentative metabolism and five cellulolytic and xylanolytic activity in plaque. It was observed that the concentration and type of N influenced the hydrolytic activity in the growth medium. Only one strain was able to show laccase activity (*Cryptococcus* sp.) in a medium supplemented with glycerol. Based on the results obtained, the isolated yeasts have the potential to be used in hydrolysis processes of lignocellulolytic residues as well as in fermentative processes.

Keywords: Cellulase, Laccase, Lignocellulolytic yeast, Palo podrido, Xylanase

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo aislar cepas de levaduras de la microbiota asociada a la degradación de la lignocelulosa de *Eucryphia cordifolia*, conocida como "Palo podrido" con capacidad celulolítica, xilanolítica y lacasa. Se aislaron e identificaron diez levaduras secuenciando las regiones ITS (Espaciador transcrito interno). Se identificaron tres levaduras de basidiomicetos y siete de ascomicetos. Todas las cepas asimilaron glucosa y xilosa, ninguna fue capaz de asimilar almidón. Tres cepas mostraron metabolismo fermentativo y cinco actividad celulolítica y xilanolítica en placa. Se observó que la actividad hidrolítica estuvo influenciada por la concentración y tipo de nitrógeno en el medio de crecimiento. Sólo una cepa fue capaz de mostrar actividad lacasa (*Cryptococcus* sp.) en medio suplementado con glicerol. En base a los resultados obtenidos, las levaduras aisladas tienen potencial para ser utilizadas en procesos de hidrólisis de residuos lignocelulolíticos así como en procesos fermentativos.

Palabras clave: Celulasa, Lacasa, Levaduras lignocelulolíticas, Palo podrido, Xilanasa

INTRODUCTION

Lignocellulosic material, and specifically wood, is naturally degraded by the action of fungi, mainly white-rot basidiomycetes such as *Trametes*, *Phanerochaete*, *Ganoderma*, *Coriolus*, *Phlebia*, *Pycnoporus*, *Mycoacia*, *Hyphodontia*, *Bjerkandera*, *Stereum*, *Hypodermella*, *Gymnopus*, *Laetiporus*, *Laetiporus Stereum*, *Fomitiporella*, *Dacrymyces*, *Sistotrema*, *Penioporella*, and *Entoloma* among others (Ríos and Eyzaguirre, 1992; Ortiz *et al.*, 2014). Its mechanism of action implies the secretion of hydrolytic enzymes such as cellulase, xylanases, and oxidative enzymes such as laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase (Arana *et al.*, 2002).

The basidiomycete fungi do not act alone; Blanchette and Shaw (1987) proposed the association of bacteria (*Enterobacter spp.*) and yeasts (*Saccharomyces bailii* and *Pichia pinus*) with basidiomycete fungi that contribute to the complete mineralization of the wood. Several studies have been conducted to understand microbial interactions during wood degradation. One of the processes studied is the wood degradation known as "Palo podrido", being the main microorganism responsible for this process the basidiomycete fungi, *Ganoderma applanatum*. This degradation is located exclusively in the south of the American continent, specifically in the Ulmo tree (*Euryphia cordifolia*).

Various microorganisms associated with wood degradation processes have been isolated using plate or liquid dilution techniques. Some genera of yeasts with xylanolytic activity, such as *Kloeckera*, *Pseudozyma*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Asterotremella*, *Sporidiobolus*, *Ogataea*, *Spenceriartinsella*, *Saturnispora*, *Galactomyces*, *Bulleromyces*, *Lindomy*, *Saturnispocesella*, *Scheffomerysia*, *Saturnispocesella*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, and *Candida* have been isolated (Morais *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2014). Similarly, yeasts with cellulolytic activities have been reported, including *Kloeckera*, *Rhodotulula*, *Debaryomyces*, *Guehomyces*, *Hanseniapora*, *Dioszegia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Arthroascus*, and *Candida* (Brandão *et al.* 2011; Sarawan *et al.*, 2013; Bautista-Guerrero

*Correspondence author: Alejandro Téllez-Jurado
e-mail: alito@upp.edu.mx

Received: February 14, 2023

Accepted: May 23, 2023; Published: September 1, 2023

et al., 2022). However, the reports of laccase-activity have only been reported for *Cryptococcus spp.* yeast (Chen and Williamson 2011) and *Yarrowia* (Lee *et al.*, 2012).

The use of yeasts with the capacity to produce laccase has advantages compared to filamentous fungi, such as easy handling of cells, more economic substrates for their cultivation, rapid growth, and easy genetic manipulation, in addition to carrying out post-translational modifications such as glycosylation, which facilitates the expression of active enzymes (Karbalaee *et al.*, 2020; Putra *et al.*, 2022). On the other hand, the lignocellulolytic activity may depend on the growth medium of the yeast. There are few reports on studies of the effect of the culture medium on the production of lignocellulosic enzymes in yeast (Lara *et al.*, 2014). This factor is important if the industrial potential of yeast is considered, as is the case of cellulases and xylanases of great economic impact because these enzymes are commonly used in textile industry, food industry, pulp, paper industry, agricultural area, and ethanol production, among others (Johnson 2013; Phitsuwan *et al.*, 2013).

This study aim was to isolate and identify yeasts present in the wood degradation of *Eucryphia cordifolia* known as "Palo podrido", by evaluating different carbon and nitrogen sources and selecting the strains with cellulolytic, xylanolytic, and laccase activities. In addition, it will allow a better understanding of this degradation type of great environmental importance due to its participation in the carbon cycle of the planet.

MATERIALS AND METHODS

Yeast isolation

Yeasts were isolated from *Eucryphia cordifolia* wood with symptoms of degradation known as "Palo podrido". The wood samples were collected from the Valdivian rainforest in the tenth region of Chile (Isla Grande de Chiloé: 42°01'20.05" S, 74°01'19.03" W), in the winter season. One Gram of the collected samples was homogenized in 10 mL of peptone water, and serial dilutions were made. YEPD agar plates (Difco™) supplemented with ampicillin (100 mg/L) were inoculated with the dilutions obtained and incubated at 28 °C for 72 h; the colonies were purified by successive reseeded on YEPD agar and kept at 4 °C on a plate until their use. Yeasts from a 72 h culture in YEPD were stored at - 20 °C in 2 mL cryotubes containing 25 % glycerol and 75 % YEPD broth (Avchar *et al.*, 2022).

Molecular identification

The isolated yeasts were cultured in YEPD broth at 28 °C in an orbital shaker at 150 rpm for 72 h. Cell cultures were centrifuged at 13,000 x g for 3 min. After separating the supernatant, the pellets were washed with 1.5 mL of sterile water and centrifuged again. The final pellet was added with the following specifications: 0.3 g of sterile glass beads with 500 µL of a solution of 10 mM HEPES, 0.5 mM sucrose, 20 mM EDTA, and pH 6.9. Each sample was vigorously vortexed for 1 min, followed by 1 min on ice; the process was repeated six times. Subse-

quently, the DNA extraction protocol of Raeder and Broda (1985) was followed. The concentration and integrity of the DNA were confirmed with a nanodrop spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) and 1 % electrophoresis gel in a 1X TAE buffer (100 V, 1 h), respectively.

The ITS region of each yeast was used as a molecular marker. The ITS region was amplified using the universal primers ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3 ') and ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAA3') (White *et al.*, 1990). Fifty microliters of the reaction mix contained 1X PCR buffer, 200 µM of each dNTP, 2 mM of MgCl₂, 10 pmol of each primer, 1-5 ng of DNA, and 1 U of Taq DNA polymerase. The amplification reaction was carried out in a thermal cycler (SimpliAmp, Thermal Cycler, Applied Biosystems) under the following conditions: 5 min of initial denaturation at 95 °C, followed by 30 denaturation cycles at 95 °C for 45 sec, alignment at 52 °C for 45 sec, and extension at 72 °C for 45 sec, with 5 min of final extension at 72 °C. The amplified products were purified with the GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma). The fragments were sent to the Institute of Cell Physiology, UNAM (Mexico) Molecular Biology Unit for sequencing. The originated electropherograms were analyzed using the BioEdit Sequence Alignment Editor software (version 7.1.11) and Chromas Lite (version 2.1). The sequences were subjected to a similarity analysis with the BLAST tool of the NCBI portal.

Phylogenetic analysis

The selected sequences for the phylogenetic analysis were aligned with the ClustalX Program version 2.1, using the parameters gap opening: 75 and gap extension and 3.3 for multiple alignments. Later, they were visually revised and optimized. The regions with ambiguous alignments were removed, and the length was uniform by eliminating the extremes. The BEAST v.1.5.4 platform was used to perform the phylogenetic analysis through Bayesian inference using a Monte Carlo Markov Chains (MCMC) algorithm.

The nucleotide substitution model selected and optimized by the Akaike information criterion (AIC) for phylogenetic inference was GTR, obtained using the jModelTest 2 software. The molecular clock that best fit the data was selected by Bayes comparison Factor (BF). After removing 10 % of the burning, the tree with the maximum credibility (MCC) was obtained by agreeing to 10,000,000 trees using the Tree Annotator software v.1.5.13. The phylogenetic tree was visualized and rooted in FigTree v1.2.2. All software used for molecular analysis is freely available.

Assays of carbohydrate assimilation

Three mL of YNB broth (Thermo Scientific) inoculated with each strain (0.3 mL, A₆₀₀ = 1) and supplemented with 0.2 % of each carbohydrate tested in 15 mL tubes were used. The carbohydrates tested were glucose, fructose, galactose, cellobiose, and xylose (Qadri and Nichols 1978). Each tube was incubated at 28 °C and 150 rpm for 2 days. The tests were carried out in triplicate. The positive assimilation of the carbohydrate was qualitatively evidenced by the presence

of turbidity in the YNB broth (Thermo Scientific), reported as growth (+) or no growth (-). On the other hand, for the qualitative detection of gas production (CO₂), the protocol described by Brooks (2008) was used.

Assays of cellulolytic and xylanolytic activity in plate

Ten microliters of each yeast strain were inoculated in 30 mL of YEPD broth (Thermo Scientific) and incubated at 28 °C in an orbital shaker at 150 rpm for 72 h. The pre-inoculum was prepared by adjusting the cell culture to A₆₀₀ = 1 in peptone water. YNB agar plates supplemented with 0.2 % birch xylan were prepared to determine xylanolytic activity. YNB agar plates supplemented with 0.2 % CMC (carboxymethylcellulose) were prepared for cellulolytic activity.

The growth of the microorganism was determined by measuring the diameter of the colony. The plates were revealed by adding 10 mL of Gram's iodine solution (1: 5) to the culture surface and incubating for 5 min at room temperature. The production of xylanases and cellulases was recorded by observing a clear area around the colony (Kasama *et al.*, 2008); only the difference between the hydrolysis halo and the colony size in triplicate of the yeasts under study was determined. The halo was measured to calculate the power index (PI) according to the formula (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012):

$$PI = \frac{\text{Diameter of hydrolysis zone (cm)}}{\text{Colony diameter (cm)}}$$

Effect of nitrogen source on microbial growth

The strains with the highest hydrolytic activity were inoculated in grown media with different Nitrogen concentrations to evaluate their effect on cellulase, xylanase, and laccase production. Birch xylan (0.2 %), and CMC (0.2 %) were used to detect xylanolytic and cellulolytic activities, respectively. The Nitrogen sources tested were Casein Peptone-H (Bioxon) (CP-H), Casein Peptone-H (MCD LAB) (CP-H2), Proteose Peptone No. 3 (BD DIFCO) (PP-3), Bacto Tryptone (DIFCO) (BT), and Gelatin Peptone (DIBICO) (GP). The concentrations tested were 1, 2, and 3 % of each Nitrogen source studied.

All tests were performed in Petri dishes with 1.5 % bacteriological agar by triplicate. The total concentration of each Nitrogen source was determined with a LECO®FP-528 C N₂/Protein determiner at the Food Technology Laboratory 2 of the UAEH (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México). The PI of each assay was determined as described in the previous section.

Determination of laccase activity

For this study, YNB agar plates supplemented with 0.2 % glucose and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 2 mM were used. Each plate was inoculated with 10 µL of each yeast strain under study and incubated at 28 °C for 96 h. The enzymatic activity was quantified by measuring PI (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). Subsequently, the effect of the carbon source on the production of this enzyme was evaluated. Plates were prepared with YNB agar supplemented with 2 mM ABTS and glucose, xylose, or glycerol at three

different concentrations (0.5, 1, and 2 %). After inoculation, strains were incubated at 28 °C for 2 days.

Data analysis

The obtained data (Power Index) were analyzed with SPSS v.12.0. ANOVA and Tukey test for means comparison of different parameters, with a significance level of 0.05, were performed. All analyses were done in triplicate.

RESULTS

Isolation and molecular identification of yeasts

A total of ten yeast strains were isolated from the "Palo podrido" sample collected on the island of Chiloé (Chile). The phylogenetic study allowed the identification of 3 strains of Phylum Basidiomycota (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*, and *Leucosporidium*) (Figure 1), and seven strains belonging to Phylum Ascomycota (*Candida*, *Sugiyamaella*, and *Spencer-mantinsiella*) (Figure 2). Table 1 shows the results obtained from molecular identification using the ITS molecular markers and the accession number of the sequences deposited in GenBank. Each isolated strain presented different morphological characteristics, so they were classified by the key to the culture in which they were isolated. The yeasts were tested to determine their monosaccharide assimilation capacity, hydrolytic enzyme production (cellulase and xylanase), and laccase production.

Assimilation

Carbohydrate assimilation tests were carried out to determine the ability of yeasts to assimilate and ferment sugars. The results are shown in Table 2. The results coincided with the data reported by the Fungal Biodiversity Center (CBS-KNAW) (<http://www.cbs.knaw.nl/>), finding fructose assimilation in all the microorganisms studied as a novelty.

The following molecules were tested as a carbohydrates source: cellobiose, fructose, galactose, glucose, mannose, and xylose. The strains AIRB-ML2.1 (*Rhodotorula* sp.), AIRB-ML5.1 (*Leucosporidium* sp.), AIRB-ML1.1 (*Candida* sp.), AIRB-ML4.1 (*Sugiyamaella* sp.), AIRB-ML5.3 (*Sugiyamaella valdiviana*), AIRB-ML6.4 (*Sugiyamaella* sp.), and AIRB-ML11.1 (*Sugiyamaella valdiviana*) were able to assimilate cellobiose, fructose, galactose, glucose, and xylose. The AIRB-ML2.1 (*Rhodotorula* sp.) and AIRB-ML4.2 (*Cryptococcus* sp.) strains were the only ones capable of metabolizing mannose. AIRB-ML4.2 (*Cryptococcus* sp.) and AIRB-ML9.2 (*Spencer-mantinsiella* sp.) do not assimilate galactose, but assimilated, cellobiose, fructose, glucose, and xylose.

A qualitative test was carried out to determine if the assimilation of the tested carbohydrates was done through fermentative processes (CO₂ production). The results indicated that *Cryptococcus* sp. (AIRB-ML4.2) ferment glucose, galactose, xylose, and mannose. *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) was able to ferment glucose, xylose, and mannose, and *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5.1) was only able to ferment xylose (Figure 3).

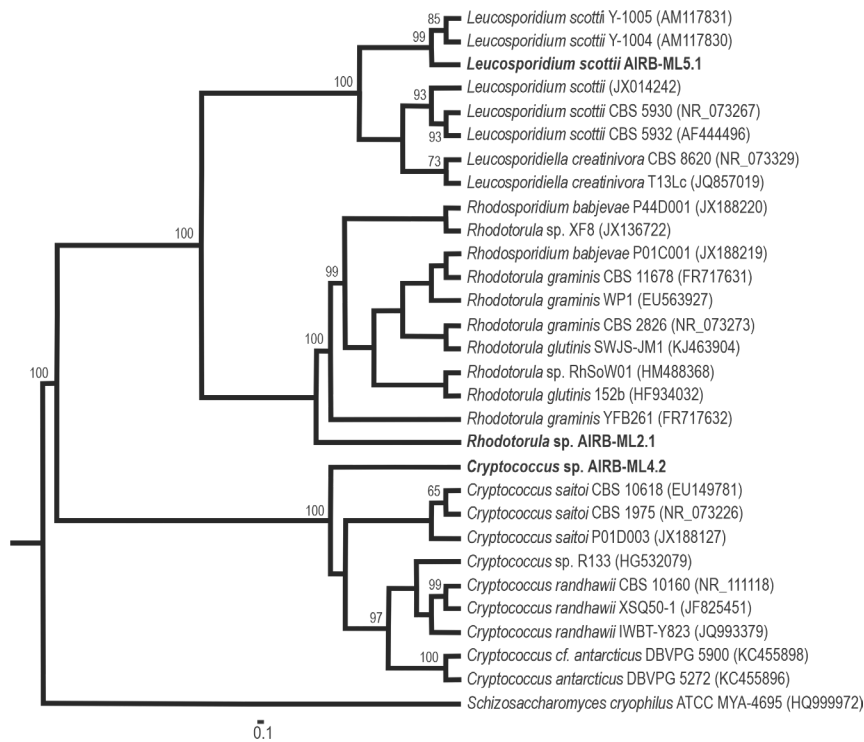


Figure 1. Phylogenetic tree of the ITS region for basidiomycetes yeast species isolated from a wood sample (in bold). *Schizosaccharomyces cryophilus* was used as an outgroup taxon. In the branches, only Bootstrap values > 50 are presented.

Figura 1. Árbol filogenético basado en la región ITS para especies de levaduras de basidiomycetos aisladas de las muestras de madera (en negrita). *Schizosaccharomyces cryophilus* fue usada con taxon externo. En las ramas se presentan solamente los valores Bootstrap > 50.

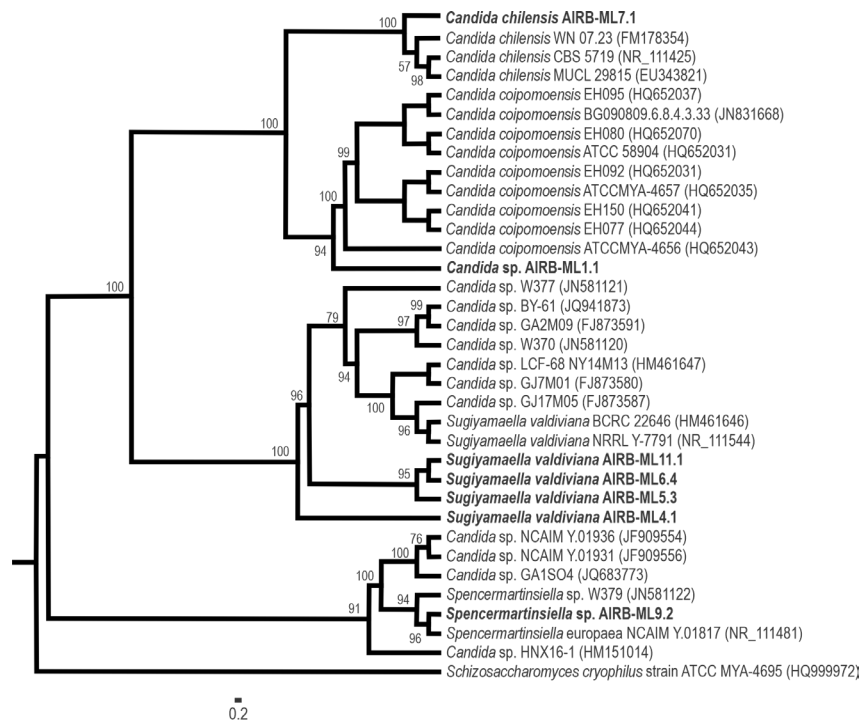


Figure 2. Phylogenetic tree of the ITS region for ascomycetes yeast species isolated from a wood sample (in bold). *Schizosaccharomyces cryophilus* was used as an outgroup taxon. In the branches, only Bootstrap values > 50 are presented.

Figura 2. Árbol filogenético de la región ITS de especies de levaduras de ascomycetos aisladas de las muestras de madera (en negrita). *Schizosaccharomyces cryophilus* fue usada como taxon externo. En las ramas se presentan solamente los valores Bootstrap > 50.

Table 1. Yeast identified from wood degradation known as “Palo podrido” and comparisons with the best BLAST match using the NCBI GenBank database.

Tabla 1. Levaduras identificadas del proceso de degradación de madera “Palo podrido” y comparaciones con el mejor alineamiento en BLAST utilizando la base de datos del GenBank del NCBI.

Culture	Best BLAST match	E value	Max identity	Gen Bank accession #
Basidiomycetous				
AIRB-ML2.1	<i>Rhodotorula</i> sp.	0.0	95	KP326401.1
AIRB-ML4.2	<i>Cryptococcus</i> sp.	0.0	93	KP326402.1
AIRB-ML5.1	<i>Leucosporidium</i> sp.	0.0	99	KP326403.1
Ascomycetous				
AIRB-ML1.1	<i>Candida</i> sp.	4e-160	96	KP326404.1
AIRB-ML4.1	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0.0	94	KP326411.1
AIRB-ML5.3	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0.0	99	KP326410.1
AIRB-ML6.4	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0.0	99	KP326406.1
AIRB-ML7.1	<i>Candida</i> sp.	0.0	99	KP326408.1
AIRB-ML9.2	<i>Spencermartinsiella</i> sp	2e-170	89	KP326409.1
AIRB-ML11.1	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0.0	99	KP326407.1

Table 2. Carbohydrate assimilation capacity of yeasts isolated from the degradation of “Palo podrido”.

Tabla 2. Capacidad de asimilación de carbohidratos de las levaduras aisladas de la degradación de “Palo podrido”.

Carbohydrate	Glucose	Galactose	Fructose	Cellobiose	Mannose	Xylose
<i>Rhodotorula</i> sp. AIRB-ML2.1	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus</i> sp. AIRB-ML4.2	+	-	+	+	+	+
<i>Leucosporidium</i> sp. AIRB-ML5.1	+	+	+	+	-	+
<i>Candida</i> sp. AIRB-ML1.1	+	+	+	+	-	+
<i>Sugiyamaella</i> sp. AIRB-ML4.1	+	+	+	+	-	+
<i>Sugiyamaella</i> sp. AIRB-ML5.3	+	+	+	+	-	+
<i>Sugiyamaella</i> sp. AIRB-ML6.4	+	+	+	+	-	+
<i>Candida</i> sp. AIRB-ML7.1	+	+	+	+	-	+
<i>Spencermartinsiella</i> sp. AIRB-ML9.2	+	-	+	+	-	+
<i>Sugiyamaella</i> sp. AIRB-ML11.1	+	+	+	+	-	+

+ = Positive test; - = Negative test.

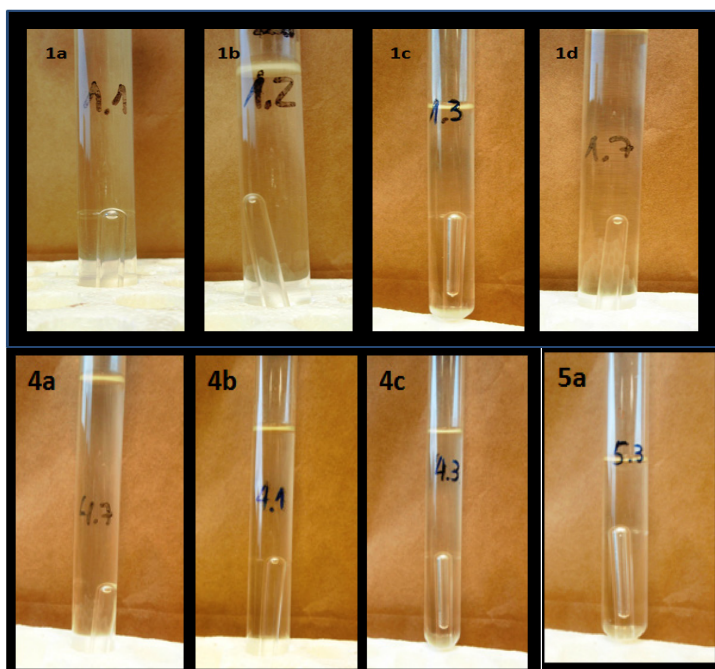


Figure 3. Fermentative assimilation assays of carbohydrates by different strains isolated from degradation wood “Palo podrido”. A = *Cryptococcus* sp. (A1 = Glucose; A2 = Galactose; A3 = Xylose; A4 = Mannose); B = *Rhodotorula* sp. (B1 = Mannose; B2 = Glucose; B3 = Xylose); C = *Leucosporidium* sp. (C1 = Xylose).

Figura 3. Pruebas de asimilación fermentativa de carbohidratos por las diferentes levaduras aisladas de la degradación de la madera “Palo podrido”. A = *Cryptococcus* sp. (A1 = Glucosa; A2 = Galactosa; A3 = Xilosa; A4 = Manosa); B = *Rhodotorula* sp. (B1 = Manosa; B2 = Glucosa; B3 = Xilosa); C = *Leucosporidium* sp. (C1 = Xilosa).

The results indicated that *Cryptococcus* sp. and *Rhodotorula* sp. presented the potential to produce ethanol using hexoses (glucose, galactose, and mannose) and pentoses (xylose). The case of *Leucosporidium* sp. showed fermentative metabolism only with xylose. The results suggest that the isolated microorganisms can assimilate simple carbon sources directing their metabolism towards biomass production and fermentative processes. The ability to metabolize simple sugars is consistent with the environment where they were isolated and may reflect adaptation to the environment.

Screening of strains with xylanolytic, cellulolytic, and laccase activity

Strains isolated from decomposing wood, "Palo podrido", apart from assimilating the carbohydrates present in the degraded material, can also participate in the degradation of lignocellulose, and contribute to the mineralization of the wood. At this stage of the work, the ability to produce enzymes that can participate in lignocellulose degradation was studied. The study focused on identifying the enzymes cellulase, xylanase, and laccase. Lignin peroxidase nor manganese peroxidase enzyme activity was not detected. The results obtained are presented in Table 3. It is observed that only 5 out of the 10 isolated microorganisms presented cellulolytic activity: *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1), *Cryptococcus* sp. (AIRB-ML4.2), *Leucosporidium* sp. (ARIB-ML5.1), *Candida* sp. (ATRM-ML1.1), and *Sugiyamaella* sp. (ARIB-ML4.1). In comparison, 7 of the 10 isolated microorganisms presented xylanolytic activity, and these were *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1), *Cryptococcus* sp. (AIRB-ML4.2), *Leucosporidium* sp. (ARIB-ML5.1), *Candida* sp. (ATRM-ML1.1), *Sugiyamaella* sp. (ARIB-ML4.1), *Sugiyamaella valdiviana* (AIRB-ML6.4) and *Candida chilensis* (AIRB-ML7.1). Only the strain of *Cryptococcus* sp. showed laccase activity.

Table 3. Determination of xylanolytic and cellulolytic activity of yeasts isolated from decomposing wood (Palo podrido) at 48 h of culture.

Tabla 3. Determinación de las actividades celololítica y xilanolítica de las levaduras aisladas de la descomposición de madera (Palo podrido) a 48 h de cultivo.

Clave	Assigned species	Xylanolytic activity (PI)	Cellulolytic activity (PI)
AIRB-ML2.1	<i>Rhodotorula</i> sp.	1.4 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.2 ^{ab}
AIRB-ML4.2	<i>Cryptococcus</i> sp.	1.3 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.0 ^{ab}
AIRB-ML5.1	<i>Leucosporidium</i> sp.	1.4 ± 0.0 ^a	1.2 ± 0.2 ^a
AIRB-ML1.1	<i>Candida</i> sp.	1.2 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.1 ^b
AIRB-ML4.1	<i>Sugiyamaella</i> sp.	1.2 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.1 ^{ab}
AIRB-ML5.3	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^c
AIRB-ML6.4	<i>Sugiyamaella</i> sp.	1.3 ± 0.1 ^a	0 ± 0.0 ^c
AIRB-ML7.1	<i>Candida</i> sp.	1.4 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0 ^c
AIRB-ML9.2	<i>Spencermartinsiella</i> sp	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^c
AIRB-ML11.1	<i>Sugiyamaella</i> sp.	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^c

Data correspond to media ± SD using three observations. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$, Tukey-HSD); PI = Power Index.

Effect of nitrogen source on cellulolytic and xylanolytic activity

The strains that presented the highest hydrolytic enzyme activities (cellulase and xylanase) were selected for the next stage, in which the effect of the type and concentration of the Nitrogen source on the production of hydrolytic enzymes was studied. Five types of peptones of different origins and total Nitrogen content were used to verify the effect of nitrogen on the growth of microorganisms and enzyme production. Three total Nitrogen concentrations (1, 2, and 3 %) were tested, and CMC and birch xylan were maintained as carbon sources.

Rhodotorula sp. showed xylanolytic activity in the medium supplemented with CP-H in all tested concentrations (1, 2, and 3 % of total N) (Table 4). Significant differences were found in the xylanolytic activity of *Rhodotorula* sp. with 2 and 3 % of total nitrogen in the culture medium. *Leucosporidium* sp. presented xylanolytic activity in CP-H and PP-3 BD (Table 4).

Regarding cellulolytic activity, it was observed that *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML 2.1) showed plaque activity in culture media supplemented with CP-H (2 and 3 % of total nitrogen) and CP-H2 (1 and 2 % of total nitrogen) (Table 5). In comparison, *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5.1) showed cellulolytic activity in plates with CP-H (3 % of total nitrogen) and CP-H2 (2 % of total nitrogen).

Rhodotorula sp. produced xylanases in all media. The best results were obtained with the medium supplemented with CP-H (enzymatic digest of casein that does minor damage to casein vitamins and amino acids such as tryptophan) at 1, 2, and 3 %. The highest xylanolytic activity was observed in the medium supplemented with 2 % GP. (Pancreatic digest of pigskin with a low concentration of fermentable carbohydrates) and in the medium supplemented with 3 % GP-H2 (acid hydrolysate of casein that racemizes amino acids and destroys vitamins). This enzymatic activity was also observed in the media supplemented with PP-3 (enzymatic digest of porcine proteins with high protease content and variable concentrations of vitamins and minerals) at 2 and 3 % and in the medium supplemented with BT (pancreatic hydrolysate of casein with low carbohydrate levels) at 2 and 3 %.

Leucosporidium sp. only presented xylanolytic activity in the media supplemented with CP-H (1 %) and PP-3 (2 and 3 %); it can be deduced that the presence of vitamins is necessary for its growth; both Nitrogen sources provide vitamins in the growth medium. The xylanolytic activity was not observed in the medium supplemented with CP-H2, where the vitamins and amino acids were completely hydrolyzed. A similar result was observed in media supplemented with BT and GP, where pancreatic digestion of casein destroys the biological quality of vitamins and proteins, not allowing optimal growth.

Regarding the effect of the Nitrogen source on cellulolytic activity, *Rhodotorula* sp. produced extracellular cellulases in the media supplemented with CP-H (2 and 3 %) and CP-H2 (1 and 2 %); both media differ only in the form of the hydrolyzed casein.

Table 4. Effect of type and total nitrogen concentration on *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) and *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5) xylanolytic activity.**Tabla 4.** Efecto del tipo y concentración total de nitrógeno sobre la actividad xilanolítica de *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) y *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5)

Nitrogen type	Total Nitrogen (%)	Xylanolytic activity in plate (PI)					
		<i>Rhodotorula</i> sp. AIRB-ML2.1			<i>Leucosporidium</i> sp. AIRB-ML5.1		
		Concentration (%)			Concentration (%)		
		1	2	3	1	2	3
CP-H	7.481 ± 0.030	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.0	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0
CP-H2	8.774 ± 0.012	0 ± 0.0	0 ± 0.0 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	0 ± 0.0	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0
PP-3	12.868 ± 0.093	0 ± 0.0	1.3 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0	1.0 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.0
BT	13.110 ± 0.022	0 ± 0.0	1.2 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.1 ^c	0 ± 0.0	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0
GP	15.140 ± 0.027	0 ± 0.0	1.6 ± 0.1 ^c	0 ± 0.0 ^d	0 ± 0.0	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0

Data correspond to media ± SD using three observations. The different letters indicated significantly different ($p < 0.05$, Tukey-HSD).**Table 5.** Effect of type and total N concentration on *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) and *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5.1) cellulolytic activity.**Tabla 5.** Efecto del tipo y concentración total de nitrógeno sobre la actividad celulolítica de *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) y *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5.1)

Nitrogen type	Total Nitrogen (%)	Cellulolytic activity in plate (PI in cm)					
		<i>Rhodotorula</i> sp. AIRB-ML2.1			<i>Leucosporidium</i> sp. AIRB-ML5.1		
		Concentration (%)			Concentration (%)		
		1	2	3	1	2	3
CP-H	7.481 ± 0.030	0 ± 0.0 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	0 ± 0.0	0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
CP-H2	8.774 ± 0.012	1.8 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
PP-3	12.868 ± 0.093	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0 ^c	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
BT	13.110 ± 0.022	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0 ^c	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
GP	15.140 ± 0.027	0 ± 0.0 ^a	0 ± 0.0 ^c	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0

Data correspond to media ± SD using three observations. Different letters indicated significantly different ($p < 0.05$, Tukey-HSD).

DISCUSSION

The molecular identification of the isolated strains was carried out based on analyzing the ITS region sequences widely used for these purposes (Takemoto *et al.*, 2008). Each sequence was compared with the GenBank database deposited in the NCBI; for the identification of the strains, the following criteria were used: expectation value (> 0.01) and identity percentage ($> 98\%$) (Baffi *et al.*, 2011).

The results obtained for the isolated strains are consistent with those reported by other authors, basidiomycetes of the genera *Rhodotorula* (Ramírez and González 1985), *Cryptococcus* (Mazza *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2014) and *Leucosporidium* of degraded wood such as the one studied in this work. Ascomycetes have also been isolated as *Sugiyamaella* (Morais *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2014), *Candida* (Cadete *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2012; Morais *et al.*, 2013), and *Spenceriella* (Morais *et al.*, 2013) among others.

During the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material carried out by basidiomycete fungi, biopolymers such as hemicellulose and cellulose are hydrolyzed, releasing a complex mixture of monosaccharides and oligosaccharides (Zadrazil *et al.*, 1982). Many non-ligninolytic microorganisms (bacteria and yeast) use the sugars derived from hydrolysis, being part of the biota associated with wood degradation

natural processes. The assimilation of hexoses is the most common metabolic process in bacteria and yeasts, and to a minor degree, the assimilation of pentoses. Of the isolated yeasts, most were able to metabolize both hexoses and pentoses; only the AIRB-ML2.1 (*Rhodotorula* sp.) and AIRB-ML4.2 (*Cryptococcus* sp.) strains showed the ability to assimilate mannose (Table 2). Microorganisms such as *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula graminis*, and *Rhodotorula glutinis* can assimilate glucose, mannose, sucrose, xylose, and mixtures of xylose, and glucose (Martins *et al.*, 2018; Hamidi *et al.*, 2020). On the other hand, it was reported that *Candida* sp., *Candida melibiosica*, *Candida dubliniensis*, and *Candida albicans* can metabolize maltose, trehalose, cellobiose, melibiose, raffinose, sucrose, lactose, glycerol, sorbitol, glucose, fructose, and xylose (Gientka *et al.*, 2016). Similarly, the assimilation of glucose, xylose, and cellobiose in *Cryptococcus* sp. and *Cryptococcus curvatus* were described (Yu *et al.*, 2014; Diamantopoulou *et al.*, 2020). *Sugiyamaella americana* can assimilate arabinose, cellobiose, glucose, galactose, ribose, sorbose, trehalose, and xylose, among others (Kurtzman 2011). The "Palo podrido" degradation that some *Ganoderma* species carry out is a degradation in which an extracellular medium rich in monosaccharides, polysaccharides, and compounds derived from lignin is generated (Ho

et al., 2020). The complete mineralization of this medium is completed by the opportunistic microbiota composed mainly of bacteria and yeasts (Tláškal *et al.*, 2021). The results showed that the isolated microorganisms mainly metabolize the monosaccharides via assimilation (biomass generation).

Concerning the fermentative metabolism observed, the results obtained allow us to establish that *Cryptococcus* sp. was able to use galactose, xylose, and mannose via fermentation, contrary to that described by Chang *et al.* (2015) and Xu *et al.* (2014), who reported the use of xylose, galactose, and mannose to produce lipids. The ability of *Cryptococcus* sp. to ferment these sugars can be an advantage since fermentative processes could be generated to produce ethanol, being an advantage over yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* which is only capable of fermenting glucose. In the case of *Rhodotorula* sp., it showed the ability to ferment glucose, mannose, and xylose. Compared with other reports, it was observed that *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula paludigena* were used to produce lipids from glucose and xylose (Gosalawit *et al.*, 2021), while Bura *et al.* (2012), and Nadal *et al.* (2020) reported ethanol production using *Rhodotorula mucilaginosa* and *R. glutinis* with galactose, mannose, and a mixture of glucose-xylose as substrates.

The next microorganism that showed fermentative capacity was *Leucosporidium* sp. with xylose as a substrate. De mot *et al.* (1985) and Tasseli *et al.* (2018) reported that *Leucosporidium capsuligenum* and *Leucosporidium cratinovorum* produced ethanol using concentrated dextrin solutions (25 % v/v) and a glucose-xylose mixture as substrates. The fermentation of carbohydrates produces CO₂ in parallel; one way to estimate this process is to observe the production of this gas using Durham hoods, a widely used qualitative method (Brooks, 2008; Wu *et al.*, 2020). The results obtained in this stage of the work agree with those described by other authors. Most yeasts can assimilate glucose, fructose, and mannose (Flores *et al.*, 2000) through the glycolytic pathway for biomass generation; however, under anaerobic conditions, pyruvate is oxidized to CO₂ through the tricarboxylic acid cycle to generate ethanol. Yeasts can also metabolize pentoses through the pentose-phosphate pathway, which, depending on environmental conditions, can contribute to glucose catabolism through the trioses formed (Maaheimo *et al.*, 2002). *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp., and *Leucosporidium* sp. can assimilate monosaccharides such as glucose, mannose, and xylose via fermentation of great biotechnological interest, making it necessary to generate adequate growth media to optimize ethanol production.

Regarding the hydrolytic activity studied, cellulase production has been observed in *Rhodotorula* sp., *R. mucilaginosa*, and *Rhodotorula slofia* (Brandão *et al.*, 2011; Rani *et al.*, 2015). On the other hand, Carrasco *et al.* (2012), and Shariq and Sohail (2020) described cellulolytic activity in *Candida gastricus*, *Candida stellate*, *Candida pullcherrima*, and *Candida tropicalis*. Brandão *et al.* (2011) isolated and identified *Cryptococcus adeliensis* strains with cellulolytic activity, and Turkiewicz *et al.* (2005) described cellulolytic activity in *Leucosporidium antarcticum*.

In the case of xylanolytic activity, Duarte *et al.* (2013) described this activity in *Rhodotorula* strains, Lara *et al.* (2014), and Bastawde *et al.* (1994) described xylanolytic activity in *Cryptococcus diffluens*, *Cryptococcus heveanensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, and *Cryptococcus flavus*. Morais *et al.* (2020), and Shariq and Sohail (2020) described xylanolytic activity in *Candida pullcherrima*, *Candida colliculosa*, *Candida stellata*, *Candida oleophila*, *Candida valida*, *Candida hellenica*, *Candida pelliculosa*, *C. tropicalis*, and *Candida pseudolambica*. Finally, Duarte *et al.* (2013) reported xylanolytic activity in *Leucosporidium scottii*. The hydrolytic enzymatic activity of isolated microorganisms in "Palo podrido" degradation may be associated with monosaccharides and oligosaccharides resulting from a primary degradation of lignocellulosic material of basidiomycetes fungi.

From the isolated strains, *Cryptococcus* sp. is the only strain that presented laccase activity. Laccase in *Cryptococcus* has been related to infective processes in humans (Sidrim *et al.*, 2013). This enzyme was also isolated from a strain of *Cryptococcus albidus* that grew in sediments of paper pulp (Singhal *et al.*, 2021). We observed that glucose and xylose were catabolic repressors of laccase at concentrations of 0.5 % or more. As described by Chen and Williamson (2011), in *Cryptococcus neoformans*, glucose is a repressor of laccase expression; these results also coincide with those reported by Zhu and Williamson (2004) and Lazera *et al.* (1996), who observed that glucose acts as a metabolic regulator since the low concentration of glucose stimulates the expression of laccase, improving the delignification process in decaying wood (Lazera *et al.*, 1996). The laccase activity detected in *Cryptococcus* sp. can contribute to the degradation of compounds of phenolic origin resulting from the hydrolysis of wood lignin. This enzymatic activity possibly contributes to reducing the toxicity of the growth medium, generating better conditions for other microorganisms sensitive to the presence of phenolic compounds.

The nitrogen naturally present in lignocellulolytic residues is very low (Martius 1992), so basidiomycete fungi have evolved to grow in environments where the C/N ratio is very high. Regarding the Nitrogen sources tested, for both strains evaluated, the variation in the percentage of peptone in the culture medium did not directly correlate with the xylanolytic activity observed. Studies of xylanase-producing in fungi have focused on studying the effect of the carbon source and the incubation temperature on enzymatic activity (Lara *et al.*, 2014). The relationship between nitrogen source and enzyme activity is not yet evident in basidiomycete fungi and some yeasts. Haapala *et al.* (1996) determined the effect of the Nitrogen source on xylanolytic activity and endo -1,4 - β -glucanase, establishing that the culture medium supplemented with protease peptone and yeast extract favors the production of both enzymes. In *Aspergillus niger*, peptone was the best Nitrogen source compared to yeast extract, (NH₄)₂SO₄, and urea to promote xylanase activity (Betini *et al.*, 2009).

In filamentous fungi, modification of the culture medium is a strategy to improve cellulase production; in an investigation carried out with *Aspergillus terreus*, Shahriari-nour *et al.* (2011) studied the effect of the Nitrogen source at different concentrations on cellulolytic activity and observed that yeast extract promotes the formation of the cellulolytic complex (FPase, CMCase, β -glucosidase) while peptone was better than urea and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Gomes *et al.* (1989) evaluated the effect of the type of peptone (meat peptone, bacto peptone, and soy peptone), cellulosic substrates, inorganic nitrogen, and urea on the production of cellulases of *Gliocladium virens*. They found that cellulose and peptone in the medium are necessary to produce enzymes. Similarly, a work by Liang *et al.* (2010) with *Anoxybacillus* sp. determined that peptone as a Nitrogen source in the culture medium registered the highest cellulolytic activity to yeast extract, tryptone, or inorganic Nitrogen sources.

By analyzing the compositions of each Nitrogen source, *Rhodotorula* sp. may need essential amino acids and vitamins with minimal degradation for optimal growth. The results obtained with the medium supplemented with CP-H2 at 3 % corroborate these observations; this Nitrogen source provides degraded amino acids and vitamins. Under this condition, xylanolytic activity is observed. The need for Nitrogen and vitamins of *Rhodotorula* sp. at this concentration is probably covered by reactivating enzyme production.

An excess in the Nitrogen concentration can generate problems in the expression of hydrolytic enzymes (Edwards *et al.*, 2011); this result differs from what was found by Elisashvili *et al.* (2011), who observed that the addition of nitrogen accelerates the growth of fungi, increasing the secretion of hydrolytic enzymes associated with growth. The differences observed are due to the origin of the Nitrogen present in the culture medium; basidiomycete fungi respond better to organic Nitrogen sources such as peptone and yeast extract, which affect microbial growth, while inorganic Nitrogen sources can affect metabolism by the lack of growth factors necessary for the development of the fungus. The addition of nitrogen affected the secretion of hydrolytic enzymes (cellulases and xylanases) in *Leucosporidium* sp., while in *Rhodotorula* sp., it only affected the secretion of xylanase. The metabolism of nitrogenous compounds is very complex. In basidiomycete, fungus is mediated by extracellular enzymes such as alanine transaminase, urease, aspartate transaminase, aspartase, glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase, and nitrate reductase. These enzymes hydrolyze proteins into amino acids that are subsequently introduced into the cell with the help of permeases (Grotjohann *et al.*, 2014). Therefore, it is expected that both the degree of hydrolysis and the quality of the proteins (amino acids content) used to complement the growth media are essential to increase the growth of the microorganisms under study.

CONCLUSIONS

In the present work, yeasts of the phylum Basidiomycota of the genera *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, and

the phylum Ascomycota of the genera *Candida*, *Sugiyamaella*, and *Spencermartinsiella* were isolated and identified from the degradative process of wood known as "Palo podrido" present in the Ulmo tree (*Euryphia cordifolia*). The lignocellulolytic capacity of the isolated strains was studied, and *Rhodotorula* sp. (AIRB-ML2.1) and *Leucosporidium* sp. (AIRB-ML5.1) were able to produce extracellular cellulases and xylanases. None of the ten isolated strains grew on media supplemented with a complex carbon source (potato starch). Only *Cryptococcus* sp. produced laccase activity with glycerol as a carbon source in the culture medium or concentrations less than 0.5 % of glucose. *Cryptococcus* sp., *Leucosporidium* sp., and *Rhodotorula* sp. showed fermentative metabolism. The origin and concentration of Nitrogen sources could influence the production of extracellular hydrolytic enzymes. The isolated yeasts showed great metabolic diversity, highlighting their ability to assimilate monosaccharides and the production of hydrolytic enzymes. This makes them of interest for their possible use in biotechnological processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This research work was carried out thanks to the support of the National Council for Science and Technology (CONACYT), Mexico.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest

REFERENCES

- Arana, A., Téllez, A., González, T., González, A. 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *BioTecnología*. 7(3):40-55.
- Avchar, R., Tiwari, S., Baghela, A. 2022. Yeast isolation methods from specialized habitats. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp. 235-254). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83749-5_12
- Baffi, M.A., Bezerra, C.S., Arevalo-Villena, M., Briones-Pérez, A.I., Gomes, E., Da Silva, R. 2011. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Annals Microbiology*. 61: 75-78.
- Bastawde, K.B., Puntambekar, U.S., Gokhale, D.V. 1994. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 13(4): 220-224.
- Bautista-Guerrero, A., Lara-Díaz, R.A., Pihen, V., Bandala, E.R., Sanchez-Sala, J.L. 2022. Isolation and test of novel yeast strains with lignin usage capability and phenolic compound resistance. *MicrobiologyOpen*, 11(5), e1326. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1326>
- Betini, J.H.A., Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. 2009. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 32: 819-24.
- Blanchette, R.A., Shaw, C.G. 1978. Association among bacteria, yeast, and basidiomycetes during wood decay. *Phytopathology*. 68: 631-637.

- Brandão, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B.M., Espírito Santo, L.C., Moliné, M., de García, V., van Broock, M., Rosa, C.A. 2011. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*. 76: 1-13.
- Brooks, A.A. 2008. Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. *African Journal of Biotechnology*. 7: 20.
- Bura, R., Vajzovic, A., Doty, S.L. 2012. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39(7): 1003-1011.
- Cadete, R.M., Melo, M.A., Lopes, M.R., Pereira, G.M.D., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Gomes, F.C.O., Lachance, M.A., Rosa, C.A. 2012. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in the Amazonian forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 1438-1440.
- Carrasco, M., Rozas, J.M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M. 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*. 12(1): 1-9.
- Chang, Y.H., Chang, K.S., Lee, C.F., Hsu, C.L., Huang, C.W., Jang, H.D. 2015. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy*. 72: 95-103.
- Chen, S.H., Williamson, P.R. 2011. Lessons from *Cryptococcal laccase*: From environmental saprophyte to pathogen. *Current Fungal Infection Reports*. 5: 233-244.
- Cruz-Ramírez, M.G., Rivera-Ríos, J.M., Téllez-Jurado, A., Maqueda-Gálvez, A.P., Mercado-Flores, Y., Arana-Cuenca, A. 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management*. 95: S256-S259.
- De Mot, R., Van Dijck, K., Donkers, A., Verachtert, H. 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22(3): 222-226.
- Diamantopoulou, P., Stoforos, N.G., Xenopoulos, E., Sarris, D., Psarianos, D., Philippoussis, A., Papanikolaou, S. 2020. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste-waters for the production of edible and medicinal mushrooms. *Biochemical Engineering Journal*. 162: 107706.
- Duarte, A.W.F., Dayo-Owoyemi, I., Nobre, F.S., Pagnocca, F.C., Chaud, L.C.S., Pessoa, A., Felipe, M.G.A., Sette, L.D. 2013. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*. 17(6): 1023-1035.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Penninckx, M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(11): 1531-1538.
- Edwards, I.P., Zak, D.R., Kellner, H., Eisenlord, S.D., Pregitzer, K.S. 2011. Simulated atmospheric N deposition alters fungal community composition and suppresses ligninolytic gene expression in a northern hardwood forest. *PLoS One*. 6(6): e20421.
- Flores, C.L., Rodríguez, C., Petit, T., Gacendo, C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 507-509.
- Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Róžańska, L., Bednarska, A.A., Błażej, S. 2016. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*. 22: 31-37.
- Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W., Steiner, W. 1989. Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 601-608.
- Gosalawit, C., Msoshothornruksa, S., Gilroyed, B.H., Mcnea, L., Boontawan, A., Ketudat-Cairns, M. 2021. The potential of the oleaginous yeast *Rhodotorula paludigena* CM33 to produce biolipids. *Journal of Biotechnology*. 329: 56-64.
- Grotjohan, N., Kowallik, W., Huang, Y. 2000. Investigations into enzymes of nitrogen metabolism of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus bovinus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 55(3-4): 203-212.
- Guo, X., Zhu, H., Bai, F.Y. 2012. *Candida cellulicola* sp. nov., a xylose-utilizing anamorphic yeast from rotten wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 242-245.
- Haapala, R., Parkkinen, E., Linko, S. 1996. Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon- web immobilized and free *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 495-501.
- Hamidi, M., Gholipour, A.R., Delattre, C., Seditighi, F., Seveiri, R.M., Pasdaran, A., Kheirandish, S., Pierre, G., Kozani, P.S., Kozani, P.S., Karimitabar, F. 2020. Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *International Journal of Biological Macromolecules*. 151: 268-277.
- Ho, P.Y., Namasivayam, P., Sundram, S., Ho, C.L. 2020. Expression of genes encoding manganese peroxidase and laccase of *Ganoderma boninense* in response to nitrogen sources, hydrogen peroxide and phytohormones. *Genes*, 11(11): 1263.
- Johnson, E.A. 2013. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts-the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 7563-7577.
- Karbalaee, M., Rezaee, S.A., Farsiani, H. 2020. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*, 235(9), 5867-5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.
- Kurtzman, C.P. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. Ch 13. In *The yeasts* (pp. 293-307). Elsevier.
- Lara, C.A., Santos, R.O., Cadete, R.M., Ferreira, C., Marques, S., Gírio, F., Oliveira, E.S., Rosa, C.A., Fonseca, C. 2014. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105: 1107-1119.
- Lazera, M.S., Pires, F.D., Camillo-Coura, L., Nishikawa, M.M., Bezerra, C.C., Trilles, L., Wanke, B. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 34: 127-131.
- Lee, K.M., Kalyani, D., Tiwari, M.K., Kim, T.S., Dhiman, S.S., Lee, J.K., Kim, I.W. 2012. Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase

- from yeast *Yarrowia lipolytica*. Bioresource Technology. 123: 636-645.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J.W. 2010. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160:1 841-52.
- Maaheimo, H., Fiaux, J., Cakar, Z.P., Bailey, J.E., Sauer, U., Szyperski, T. 2002. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (¹³C) labeling of common amino acids. European Journal of Biochemistry 268: 2464-2479.
- Martins, G.M., Bocchini-Martins, D.A., Bezzerra-Bussoli, C., Pagnocca, F.C., Boscolo, M., Monteiro, D.A., Gomes, E. 2018 The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. Brazilian Journal of Microbiology. 49(1): 162-168.
- Martius, C. 1992. Density, humidity, and nitrogen content of dominant wood species of floodplain forests (várzea) in Amazonia. Holz als Roh und Werkstoff. 50(7-8): 300-303.
- Mazza, M., Refojo, N., Bosco-Borgeat, M.E., Taverna, C.G., Trovero, A.C., Rogé, A., Davel, G. 2013. *Cryptococcus gattii* in urban trees from cities in North-eastern Argentina. Mycoses 56: 646-650.
- Morais, C.G., Cadete, R.M., Uetanabaro, A.P.T., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A. 2013. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. Fungal Genetics and Biology. 60: 19-28.
- Morais, C.G., Sena, L.M., Lopes, M.R., Santos, A.R.O., Barros, K.O., Alves, C.R., Uetanabaro, A.P.T., Lachance, M.A., Rosa, C.A. 2020. Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. Fungal Biology. 124(7): 639-647.
- Ortiz, R., Párraga, M., Navarrete, J., Carrasco, I., de la Vega, E., Ortiz, M., Herrera, P., Jurgens, J.A., Held, B.W., Blanchette, R.A. 2014. Investigations of Biodeterioration by Fungi in Historic Wooden Churches of Chiloé, Chile. Microbial Ecology. 67: 568-575.
- Péter, G., Dlačuchy, D., Tornai-Lehoczki, J., Suzuki, M., Kurtzman, C. 2011. *Spencermartinsiella europaea* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Trichomonas caceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 993-1000.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K. 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. Folia Microbiology. 58: 163-176.
- Putra, F.J.N., Kahar, P., Kondo, A., Ogino, C. 2022. Valorization of lignin and its derivatives using yeast. Processes. 10(10), 2004. <https://doi.org/10.3390/pr10102004>
- Qadri, S.H., Nichols, C.W. 1978. Tube carbohydrate assimilation method for the rapid identification of clinically significant yeasts. Medical Microbiology and Immunology. 165(1): 19-27.
- Raeder, U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology. 1: 17-20.
- Ramírez, C., González, A. 1985. *Rhodotorula nothofagi* sp. nov., isolated from decayed wood in the evergreen rainy Valdivian Forest of southern Chile. Mycopathologia. 91(3): 171-173.
- Rani, V., Dash, S., Nain, L., Arora, A. 2015. Expression of novel glucose tolerant β -glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 4(3): 380-387.
- Ríos, S., Eyzaguirre, J. 1992. Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 37: 667-669.
- Sarawan, S., Mahakhan, P., Jindamorakot, S., Vichitphan, K., Vichitphan, S., Sawaengkaew, J. 2013. *Candida konsanensis* sp. nov., a new yeast species isolated from *Jasminum adenophyllum* in Thailand with potentially carboxymethyl cellulase-producing capability. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29: 1481-1486.
- Shahriarinnour, M., Wahab, M.N.A., Mohamad, R., Mustafa, S., Ariff, A.B. 2011. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. African Journal of Biotechnology. 10: 7459-7467.
- Shariq, M., Sohail, M. 2020. Production of cellulase and xylanase from *Candida tropicalis* (MK-118) on purified and crude substrates. Pakistan Journal of Botany. 52(1): 323-328.
- Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., Leite, J.J.G., Maranhão, F.C.D.A., Lima, R.A.C., Castelo-Branco, D.D.S.C.M., Bandeira, T.J.P.G., Cordeiro, R.A., Brilhante, R.S.N. 2013. *Trichophyton tonsurans* strains from Brazil: phenotypic heterogeneity, genetic homology, and detection of virulence genes. Canadian Journal of Microbiology. 59(11): 754-760.
- Singhal, A., Choudhary, G., Thakur, I.S. 2012. Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 42: (2)113-124.
- Takemoto, S., Hwang, W.J., Takeuchi, M., Itoh, T., Imamura, Y. 2008. Anatomical characterization of decayed wood in standing light red meranti and identification of the fungi isolated from the decayed area. Journal of Wood Science. 54: 233-241.
- Tláskal, V., Brabcová, V., Větrovský, T., Jomura, M., López-Mondéjar, R., Oliveira Monteiro, L.M., Saravia, J.P, Human, Z.R., Cajthaml, T., Baldrian, P. 2021. Complementary roles of wood-inhabiting fungi and bacteria facilitate deadwood decomposition. Msystems, 6(1), e01078-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01078-20>
- Turkiewicz, M., Pazgier, M., Donachie, S.P., Kalinowska, H. 2005. Invertase and α -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. Polish Polar Research. 125-136.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press. USA. 315-332.
- Wu, R., Chen, D., Cao, S., Lu, Z., Huang, J., Lu, Q., Chen, Y., Che, X., Guan, N., Wei, Y., Huang, R. 2020. Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO4 gene. RSC Advances. 10(4): 2267-2276.
- Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., Chen, S. 2014. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. Biomass and Bioenergy. 71: 340-349.
- Zadrazil, F., Grinbergs, J., González, A.E. 1982. Palo podrido-Decomposed wood which was used as Feed. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 15: 167-171.
- Zhu, X., Williamson, P.R. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Research. 5(1): 1-10.



Cambios bioquímicos y morfométricos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo

Biochemical and morphometric changes in *Coffea arabica* after a treatment with ethyl methanesulfonate

José Gregorio Joya-Dávila^{1*}, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli¹, María Celina Luján-Hidalgo¹, Leslie Alondra Serrano-Gómez¹, Benigno Ruíz-Sesma²

¹ Tecnológico Nacional de México/IT de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Carretera Panamericana km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29050, México.

² Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 80. Carretera Federal Mérida - Chetumal Vía Corta km 169, Chunhuhub, Carrillo Puerto, Quintana Roo, C.P. 77160. México.

RESUMEN

El uso de metanosulfonato de etilo (EMS) es una tecnología utilizada para aumentar la variabilidad genética de cultivos. En el mejoramiento genético del café, EMS podría generar nuevos rasgos fenotípicos y bioquímicos de importancia agrícola. El objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios en la morfología y producción de metabolitos secundarios en plantas de café generadas a partir de líneas celulares tratadas con EMS. Callos de *Coffea arabica* cv., Borbón fueron expuestos a nueve concentraciones de EMS, posteriormente, se determinó el porcentaje de supervivencia y la biomasa fresca. Se regeneraron plantas en medio MS suplementado con vitaminas, antioxidantes y 6-bencilaminopurina. A las 20 semanas se registraron cambios morfológicos observados con respecto a los callos no tratados con EMS. Empleando hojas secas se hizo la extracción de metabolitos secundarios, la cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución. La supervivencia y crecimiento del callo disminuyó con el aumento de la concentración de EMS (dosis letal media: 148.8 mM), en plántulas generó cambios en la morfología de la hoja, enanismo y la formación de tres meristemas, que aumentarían el número de hojas. Finalmente, 140 mM de EMS incrementó el contenido de cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico.

Palabras clave: mutagénesis, EMS, variabilidad genética, metabolismo secundario

ABSTRACT

The use of ethyl methanesulfonate (EMS) is a technology used to increase the genetic variability of cultivars. In coffee genetic improvement, EMS could generate new phenotypic and biochemical traits of agricultural importance. The objective of this research was to determine the changes in morphology and production of secondary metabolites in coffee plants generated from cell lines treated with EMS. Callus of *Coffea arabica* cv., Borbon were exposed to nine concentrations of EMS, and subsequently, the percentage of survival and fresh biomass were determined. Plants were regenerated on MS medium supplemented with vitamins, antioxidants, and

6-benzylaminopurine. At 20 weeks, morphological changes were observed compared to the callus not treated with EMS. Using dried leaves, secondary metabolites were extracted and quantified by high-performance liquid chromatography. Callus survival and growth decreased with increasing EMS concentration (mean lethal dose: 148.8 mM), in seedlings, it generated changes in leaf morphology, dwarfism, and the formation of three meristems, which would increase the number of leaves. Finally, 140 mM of EMS increased the content of caffeine, caffeic acid, and chlorogenic acid.

Keywords: mutagenesis, EMS, genetic variability, secondary metabolism

INTRODUCCIÓN

De las semillas del café se origina la bebida más consumida a nivel mundial denominada café, su origen y diversidad se ubica en las montañas de Etiopía en África (Mishra, 2019). El café se caracteriza por su crecimiento arbustivo, con dos meristemas caulinares opuestos que moldean la arquitectura de las ramas, las hojas son verdes, elípticas y apiculadas, con diferencias en la coloración de los brotes y frutos (IPGRI, 1996; González, 2022). En México el cultivo de café abarca una superficie de 710,897 ha distribuidas en 14 estados, (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera – SIAP, 2022). De las dos especies comerciales del género *Coffea* la más cultivada es *C. arabica* por sus atributos en taza, la cual, actualmente presenta limitantes en la producción al ser altamente susceptible a enfermedades y plagas, conllevando a la exploración de nuevos genotipos resistentes. La generación de nuevos cultivares de café utilizando el mejoramiento convencional, requiere la evaluación de siete ciclos de autopolinización de semilla a semilla, en un tiempo de 30 años (Loyola *et al.*, 2016), además, la estrecha diversidad genética del café y su comportamiento perenne, requieren de procesos que reduzcan el tiempo de los protocolos de mejoramiento genético (Cui *et al.*, 2020).

La mutagénesis *in vitro* mediante agentes químicos se ha convertido en un instrumento útil para incrementar la variabilidad genética con aplicación en fitomejoramiento y

*Autor para correspondencia: José Gregorio Joya Dávila
 Correo-e: d19270972@tuxtla.tecnm.mx

Recibido: 17 de febrero de 2023

Aceptado: 30 de abril de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023

genómica funcional (Suprasanna *et al.*, 2015). El metanosulfonato de etilo (EMS) es el agente mutagénico de uso común en plantas para generar cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos dependientes de la dosis de exposición. Los rasgos morfológicos y bioquímicos permiten la diferenciación fenotípica entre plantas silvestres y mutantes, además, han sido, los primeros marcadores de selección de plantas de utilidad en la agricultura (Purente *et al.*, 2020). Serrat *et al.* (2014) reportan que molecularmente EMS alquila la base nitrogenada guanina en el oxígeno seis, ocupando uno de los puentes de hidrógeno de la unión con la base citosina generando una transición de G:C por A:T, por consiguiente, ocurre cambio en la secuencia de aminoácidos que conforman proteínas y en patrones de expresión. Al respecto, en *Agave americana* el tratamiento con EMS incrementó la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de metabolitos secundarios (Reyes *et al.*, 2019). La PAL inicia la ruta de biosíntesis del ácido cafeico y ácidos clorogénicos, metabolitos presentes en el café que son utilizados por la planta como defensa frente a patógenos (Luján-Hidalgo *et al.*, 2020). El enanismo es un efecto característico después de la mutación en muchos cultivares, generando entrenudos cortos y reducción de algunas estructuras vegetativas (Rime *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2023), que pueden ser de utilidad agronómica en muchos cultivares. A la fecha no se han generado variedades de *C. arabica* usando EMS, que proporcionen nuevos rasgos bioquímicos y fenotípicos importantes para el mejoramiento genético del café. El objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios en la morfología y producción de metabolitos secundarios en plantas de café generadas a partir de callos tratados con EMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron callos inducidos a partir de hojas de *Coffea arabica* cv., Borbón, cultivados en recipientes de vidrio según Joya-Dávila *et al.* (2023). La composición del medio de cultivo fue 2.2 g L⁻¹ de medio Murashige y Skoog (1962) [MS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.] suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.2 g L⁻¹ de ácido cítrico y 0.2 g L⁻¹ de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®), 7.25 µM de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.4 µM de 6-bencilaminopurina (BAP), el pH del medio se ajustó a 5.7 y se solidificó con Phytigel™ (Sigma®, 2.5 g L⁻¹). Las condiciones de cultivo correspondieron a oscuridad total en cámara bioclimática a 25 ± 1 °C, por un periodo de 12 semanas con tres subcultivos.

Tratamiento con EMS

Callos de 200 mg (n = 20) fueron expuestos a nueve concentraciones EMS (0, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 220 mM) (Sigma®-Aldrich), durante dos horas, con agitación manual cada 10 min (Bolívar *et al.*, 2018 con modificaciones). Se realizó la inactivación del EMS con 100 mM de tiosulfato de sodio durante cinco minutos, seguido de tres lavados con agua estéril. Posteriormente, los callos fueron trasladados a medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) líquido durante una hora en

agitación, se secaron en papel absorbente estéril por cinco minutos. Seguidamente, se cultivaron en medio MS (2.2 g L⁻¹) suplementado con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de Phytigel™, el pH se ajustó a 5.7, los cultivos permanecieron en oscuridad a 25 ± 1 °C.

Treinta días después fueron transferidos a medio de inducción de callo embriogénico reportado por Joya-Dávila *et al.* (2023), conformado por medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹), suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), 17.6 µM de BAP, 1.8 µM de 2,4-D, 30 µM de AgNO₃ y se solidificó con Phytigel™ (Sigma®, 2.5 g L⁻¹), el pH se ajustó a 5.7. Las condiciones de cultivo correspondieron a oscuridad total en cámara bioclimática a 25 ± 1 °C. Después de 25 d se evaluó el incremento de masa fresca (IMF) según la ecuación [1], el porcentaje de supervivencia y la dosis letal media (DL₅₀) se calculó mediante regresión lineal.

$$IMF = \text{masa final} - \text{masa inicial} \quad [1]$$

Regeneración de plantas

Para las siguientes determinaciones fueron considerados los tratamientos 0, 140 y 160 mM de EMS, por presentar la cantidad de biomasa embriogénica requerida. Los callos embriogénicos fueron transferidos a medios de cultivo para la maduración de embriones, conformado por medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹), suplementado con vitaminas (piridoxina 4.86 µM, ácido nicotínico 8.12 µM, tiamina 29.65 µM y myo-inositol 554 µM), sacarosa 30 g L⁻¹, L-Cisteína 0.04 g L⁻¹, extracto de malta 0.8 g L⁻¹, caseína 0.2 g L⁻¹, 4.44 µM de BAP, carbón activado 2 g L⁻¹ y 2.8 g L⁻¹ Phytigel™, el pH se ajustó a 5.6. Posteriormente, embriones somáticos cotiledonares se transfirieron a medio de germinación conformado por MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) suplementado con vitaminas (piridoxina 4.86 µM, ácido nicotínico 8.12 µM, tiamina 29.65 µM y myo-inositol 554 µM), sacarosa 30 g L⁻¹, GA₃ (Sigma®, 2.89 µM) y Phytigel™ (Sigma®, 2.8 g L⁻¹), pH 5.6 (Sanglard *et al.*, 2019).

Determinación de parámetros morfométricos

Un grupo de 50 embriones somáticos cotiledonares seleccionados al azar por tratamiento (0, 140 y 160 mM de EMS) fueron distribuidos en cinco grupos (n = 10). Después de cuatro semanas de cultivo en medio de germinación fueron transferidos a medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹ y 2.8 g L⁻¹ Phytigel™, el pH se ajustó a 5.6 (se realizaron dos subcultivos). Transcurridas 16 semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia de plantas y los parámetros morfológicos, número de hojas, altura de plantas, dimensiones de la hoja, forma y tipo de ápice, adicionalmente, se registraron cambios estructurales observados con respecto a los callos no tratados con EMS (0 mM). Las determinaciones se realizaron con base en el catálogo global de café arábica de world coffee research (2019) y descriptores morfométricos reportados para Chiapas por González (2022).

Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios

La extracción se realizó utilizando ultrasonido con una frecuencia de 20 kHz, potencia de 130 W, a 35 °C por 20 min.

Empleando 250 mg de hojas deshidratadas y pulverizadas (Horno a 35 °C; hasta peso constante) en 10 mL de metanol al 80 %. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para separar sólidos, se filtró al vacío usando papel Whatman número dos, al final se lavó con 5 mL de metanol al 100 %, este proceso se realizó dos veces. Por medio de rotaevaporación a 65 °C y vacío de -9.82 PSI, fue separado el disolvente y el agua restante se eliminó por liofilización a -39 °C y 0.47 mBar. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta las determinaciones cromatográficas. Todo el procedimiento se realizó en cuarto oscuro con luz difusa y protegiendo los extractos con una cubierta de aluminio. Se utilizó un procesador de sonda ultrasónica GEX130PB (Sonic and Materials Inc) y un liofilizador LABCONCO FreeZone 4.5 Plus (Adaptado de Luján-Hidalgo *et al.*, 2020).

La cuantificación de ácido cafeico (AC), cafeína (CF), ácido clorogénico (CL) y ácido gálico (AG), se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución [PerkinElmer Series 200 HPLC Systems, Shelton, CT, USA.] conectado a un detector de arreglo de diodos. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en agua tridestilada (5 mg mL⁻¹) y se filtraron con una membrana de 0.22 µm. Se empleó una columna Kromasil 100-5-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm, 100A -SPELCO, Bellefonte, CA, USA). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ácido fórmico al 0.1 % (80:20 v v⁻¹) (FASE A) y ácido fórmico al 1 % (v v⁻¹) (FASE B) en una relación 10:90 con un flujo constante de 1 mL por minuto en modo isocrático. La cuantificación se realizó a 280 nm para CF y AG, a 320 nm para AC y CL. Se inyectaron 10 µL de muestra. Las curvas de calibración se realizaron con estándares Sigma-Aldrich® de CL, AG, AC y CF (50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm) disueltos en agua tridestilada. Los metabolitos fueron expresados en µg por g⁻¹ de hoja seca

Análisis estadístico de los datos

Todos los ensayos se establecieron en un diseño completamente al azar, cada tratamiento estuvo conformado por cuatro repeticiones. Para cada variable se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey (P ≤ 0.05), en el paquete estadístico SAS® OnDemand (2022).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se observó una correlación negativa entre la supervivencia de callos y la dosis de EMS (Figura 1). La supervivencia celular disminuyó con el aumento de la concentración de EMS, con diferencias estadísticas significativas con respecto al control a partir de la dosis de 140 mM, llegando a ser letales a dosis superiores de 180 mM. Los callos no viables se caracterizaron por una coloración marrón y compactos. En esta investigación la dosis letal media calculada (148.8 mM; 60 min) y la dosis letal (200 mM; 60 min), fueron bajas con respecto a las reportadas por Bolívar *et al.* (2018) para la variedad Catuaí, con una DL₅₀ de 185.2 mM y dosis letal de 555.7 mM con exposición de 60 min. Lo que podría interpretarse como una respuesta diferencial entre variedades de café al tratamiento con EMS, situación que también fue observada por Chen *et*

al. (2023) en tres variedades de *Arachis hypogaea*. Estos resultados indican que es necesario determinar la dosis óptima de EMS previo a la inducción de mutaciones, que permita obtener células totipotenciales y alta frecuencia de mutaciones (Mba *et al.* 2010).

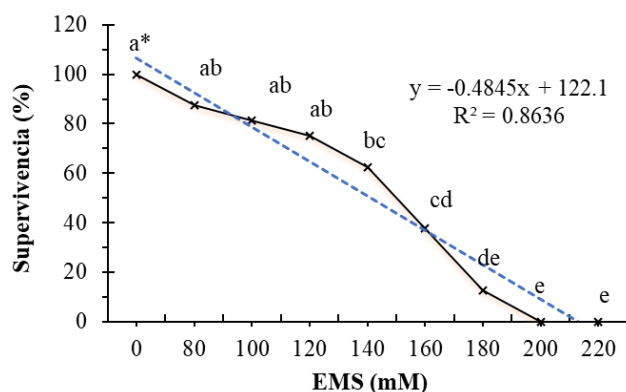


Figura 1. Efecto de concentraciones crecientes de EMS en la supervivencia de callos de *C. arabica*. *Diferente literal en la misma serie indica diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

Figure 1. Effect of increasing concentrations of EMS on callus survival of *C. arabica*.

*Different literal in the same series indicates significant differences (Tukey, P < 0.05).

Con respecto al tratamiento control sin EMS, la masa fresca del callo disminuyó significativamente 81 y 56 % con 80 y 100 mM de EMS respectivamente. Concentraciones posteriores presentaron un incremento estadísticamente similar al control hasta 140 mM, dosis posteriores inhibieron el crecimiento (160 mM, 78 %; 180 mM, 100 %) (Figura 2). Los resultados encontrados pueden deberse a un efecto hormético de EMS en el crecimiento celular, al respecto, se ha reportado que la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* (auxótrofa para el aminoácido histidina) presentan diversas respuestas a la exposición con mutágenos químicos, altas concentraciones son letales, mientras que concentraciones por debajo de la DL₅₀ aumentan el número de colonias que mediante un mecanismo de adaptación/replicación pueden crecer en medios carentes de histidina por la inducción de mutaciones (Calabrese *et al.*, 2011).

La mayor formación de callo embriogénico posterior al tratamiento con EMS se observó en el control y las concentraciones de 140 y 160 mM (dosis cercanas a la DL₅₀), dosis superiores inhibieron la formación embriogénica. En cuanto a las características morfológicas fueron similares en los tres casos (Figura 3 a-c). Con respecto al número de embriones somáticos recuperados (n = 4) fue significativamente menor con el incremento de la dosis (47, 21 y 8 embriones cotiledonares respectivamente). Resultado que puede atribuirse al efecto genotóxico generado por EMS sobre la plasticidad y totipotencia de las células embriogénicas (Behera *et al.*, 2012). De acuerdo con Castro *et al.* (2006) una célula es viable si tiene la capacidad de crecer y desarrollarse, por lo que, los callos tratados con EMS que no presentaron incremento de

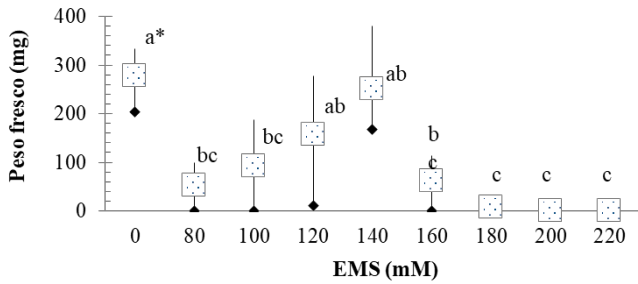


Figura 2. Masa fresca en callos de *C. arabica* expuestos a diferentes concentraciones de EMS. *Diferente literal indica diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).

Figure 2. Fresh mass in callus of *C. arabica* exposed to different concentrations of EMS. *Different literal indicates significant differences (Tukey $P < 0.05$).

biomasa y formación de embriones fueron determinados como no viables, mismos que en posteriores subcultivos presentaron necrosis y deshidratación, sin respuesta a medios de multiplicación celular.

Las plantas desarrolladas de callos expuestos a EMS presentaron aspecto similar con las plantas control (Figura 3 d-f), con diferencias estadísticas en las dimensiones estructurales (Tabla 1). El EMS generó enanismo y por consiguiente acortamiento de entrenudos como se observa en la Figura 4 (d). La altura del tallo se redujo entre 46 y 51 %, la disminución del tamaño de las hojas estuvo acompañado de cambios en la forma, en plantas control la forma fue elíptica y las variantes EMS presentaron formas ovada, irregular y lanceolada. La supervivencia de plántulas disminuyó a la par con el incremento de las dosis de EMS, los embriones que no lograron desarrollarse se caracterizaron por una morfología de tallo y hoja cotiledonar deforme, que con el tiempo presentaron oxidación de forma ascendente hasta generar necrosis general, comportamiento similar observado en callos y células en suspensión de *C. arabica* (Bolívar *et al.*, 2018). En cuanto al número de hojas, solo se observó diferencias significativas entre el control y la concentración más alta evaluada, rela-

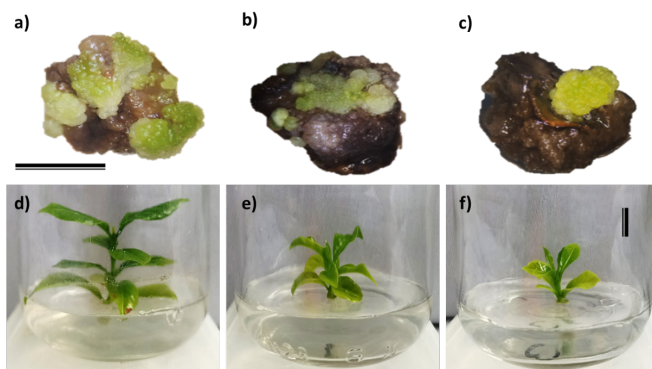


Figura 3. Formación de callos embriogénicos y desarrollo de plantas de *C. arabica* cv., Borbon posterior al tratamiento con EMS (a y d = Control; b y e = 140 mM; c y f = 160 mM). barra negra = 10 mm.

Figure 3. Embryogenic callus formation and plant development of *C. arabica* cv., Borbon following EMS treatment (a and d = Control; b and e = 140 mM; c and f = 160 mM). Black bar = 10 mm.

cionado con la disminución en la velocidad de crecimiento. Estos cambios morfométricos son efectos característicos de la exposición de EMS en células vegetales, como se ha reportado en varios modelos de estudio, entre ellos *Agave americana* (Reyes *et al.*, 2019), mango cv., Arka Puneet (Rime *et al.*, 2019) y mandarina (Mallick *et al.*, 2016).

Tabla 1. Parámetros morfométricos modificados por EMS en plantas de *Coffea arabica*.

Table 1. Morphometric parameters modified by EMS in *Coffea arabica* plants.

EMS (mM) ¹	Altura	LH ³	AH ⁴	Número de hojas	Supervivencia de plantas
	mm				
0	45.6 ± 4.6 ^{a*}	2.7 ± 0.24 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	9.6 ± 0.4 ^a	72 ± 12 ^a
140	23.2 ± 5.2 ^b	1.7 ± 0.54 ^b	1.0 ± 0.5 ^b	8.8 ± 1.2 ^{ab}	52 ± 8 ^b
160	21.0 ± 9.4 ^b	1.9 ± 0.60 ^b	0.86 ± 0.3 ^b	8.0 ± 0 ^b	26 ± 14 ^c
DMS ²	8.3	0.58	0.47	1.37	16.0

¹Concentración de EMS evaluada. ²Diferencia mínima significativa.

³Largo de la hoja. ⁴Ancho de la hoja. *Diferente literal entre columnas indica diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $P < 0.05$).

Algunas variantes somaclonales EMS (160 mM) presentaron distintas formas de ápice (puntiagudo, obtuso y tridentado) y cambios en la coloración de la hoja, entre ellos, clorosis, albinismo y mosaicos (Figura 4 d-e). Anteriormente, ya se ha reportado que EMS ocasiona cambios en el contenido y distribución de la clorofila en las hojas, relacionados con la biosíntesis de esta macromolécula (Joya-Dávila y Gutiérrez, 2020; Pawar *et al.*, 2010); en condiciones *in vitro* este tipo de mutantes pueden desarrollarse al suplementar los medios de cultivo con fuentes de carbono, pero agrónomicamente no tienen utilidad.

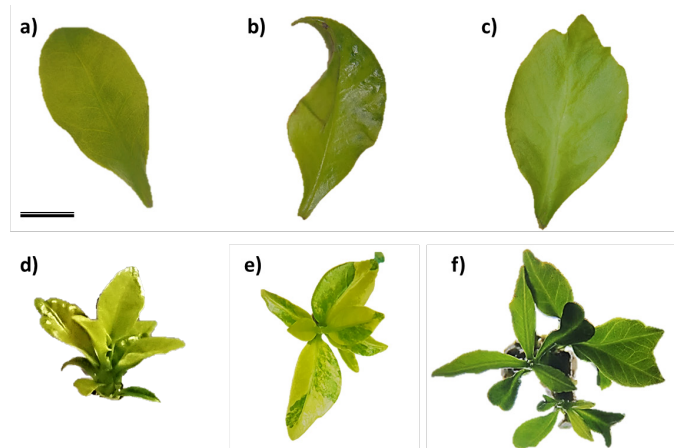


Figura 4. Cambios estructurales en plantas de *C. arabica* cv., Borbon tratadas con EMS. a-c) diferentes formas y ápice de la hoja. d) clorosis y entrenudos cortos. e) mosaicos cloróticos. f) presencia de tres meristemos y doble nervadura central. Barra negra = 5 mm.

Figure 4. Structural changes in *C. arabica* cv., Borbon plants treated with EMS. a-c) different shapes and apex of the leaf. d) chlorosis and short internodes. e) chlorotic mosaics. f) presence of three meristems and double midrib. Black bar = 5 mm.

Por último, en plantas obtenidas de callos tratados con 140 mM de EMS se observó la presencia de dos nervaduras primarias y tres meristemas caulinares por entrenudo (Figura 4 f). A la fecha todas las variedades de *Coffea* sp., están conformadas por dos meristemas caulinares, esta modificación estructural inducida por EMS pudiese incrementar el área foliar y número de frutos a cosechar. Estos cambios morfológicos pueden corresponder a que la exposición de los callos a EMS modificó los patrones de expresión de genes responsables de la conformación estructural de las plantas (Zhang *et al.*, 2016).

La producción basal de cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico aumentó 15, 6 y 11 % respectivamente en plantas tratadas con 140 mM de EMS; mientras que las plantas tratadas con 160 mM no generaron cambios significativos con respecto a las plantas control, exceptuando el contenido de ácido clorogénico que disminuyó (Tabla 2). En todos los tratamientos las señales analíticas para el ácido gálico no fueron cuantificables. Se ha reportado que el EMS incrementa el contenido de metabolitos secundarios (fructanos) y la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de agave (Reyes *et al.*, 2019). La producción basal de metabolitos secundarios está regulada por la acción enzimática en las rutas de biosíntesis, en el caso de los fenilpropanoides la actividad catalítica de PAL es clave en el inicio de la producción de fenoles (ácido cafeico o clorogénico). La utilidad de estos metabolitos está relacionada con mecanismos de defensa bioquímica relacionados con la biosíntesis de lignina (Campa *et al.*, 2005), que en procesos de infección limitan el crecimiento microbiano o los confina, impidiendo la difusión de toxinas y extracción de nutrientes de la célula (de Melo *et al.*, 2020).

Tabla 2. Efecto de EMS en la concentración de metabolitos secundarios en hojas de *Coffea arabica* cv., Borbón.

Table 2. Effect of EMS on the concentration of secondary metabolites in leaves of *Coffea arabica* cv., Borbon.

EMS (mM) ¹	Cafeína	Ácido cafeico	Ácido clorogénico	Ácido gálico
	µg/g HS ³			
0	8464 ± 210 ^{b*}	1288.3 ± 26 ^{ab}	11681.9 ± 294 ^b	ND
140	9577 ± 312 ^a	1360.1 ± 46 ^a	12960.5 ± 299 ^a	ND
160	8191 ± 240 ^b	1220.1 ± 11 ^b	10397.2 ± 111 ^c	ND
DMS ²	743.7	72.4	852.7	-

¹Concentración de EMS evaluada. ²Diferencia mínima significativa. ³Hoja seca. ND = No detectado * Diferente literal entre columnas indica diferencias significativas entre tratamientos (Tukey P < 0.05).

Por otro lado, incrementar el contenido de cafeína en cafetos tiene importancia para la salud. Se ha reportado que el consumo de café disminuye el riesgo de la enfermedad de Parkinson, ya que sus efectos están mediados por la cafeína a través de la acción antagonista del receptor de adenosina (Ishibashi *et al.*, 2022). En agricultura el contenido de cafeína está relacionado con mecanismos de defensa bioquímica a fitopatógenos; en café al momento de la esporulación de

Hemileia vastatrix las plantas susceptibles incrementan la síntesis de cafeína (Luján-Hidalgo *et al.*, 2020), posiblemente por su acción antimicrobiana al inhibir estructuras de crecimiento (Cuadrado *et al.*, 2009).

CONCLUSIÓN

La determinación de la dosis adecuada de EMS permite inducir cambios de importancia en plantas de *C. arabica*. Dosis superiores a la DL₅₀ generan cambios no deseables y disminuyen la supervivencia celular, dosis inferiores en particular 140 mM, ocasionó cambios estructurales importantes en la morfología caulinar del tallo con utilidad en las labores de recolección y poda, además, incrementó el contenido de metabolitos secundarios de alto valor agronómico en lo referente a la resistencia del café al ataque de fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado a través de la beca para JDJG (CVU. 789022) y a el Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el apoyo financiero al proyecto 14102.22-P. Al laboratorio de analítica y biología molecular del TecNM - Tuxtla Gutiérrez, por el apoyo en el desarrollo de los experimentos bioquímicos.

REFERENCIAS

- Behera, M., Panigrahi, J., Mishra, R., and Rath, S. 2012. Analysis of EMS induced *in vitro* mutants of *Asteracantha longifolia* L. Nees using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*. pp 39-47.
- Bolívar, A., Valdez, M., and Gatica, A. 2018. Responses of Arabica coffee (*Coffea arabica* L. var. Catuai) cell suspensions to chemically induced mutagenesis and salinity stress under *in vitro* culture conditions. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 54(6): 576-589. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9918-x>.
- Calabrese, E., Stanek, E., and Nascarella, M. 2011. Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 726(2): 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.04.006>.
- Campa, C., Venkataramaiah, M., Kochko, A., G al, L., Bourgeois, M., Moreau, C., Harmon, S. and Noirot, M. 2005. Candidate gene strategy for the study of the chlorogenic acid biosynthesis. In: ASIC 2004. 20th International Conference on Coffee Science, Bangalore, India, 11-15 October 2004. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). pp 644-650.
- Castro, L., Escobedo, R., and Miranda-Ham, M. 2006. Measurement of cell viability *in vitro* cultures. In *Plant Cell Culture Protocols*. 318: 71-76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:071>.
- Chen, H., Xiong, F., Xu, R., Chen, X., Zhong, H., Zhang, Y., Lan, X., Zhang, H., Chen, Y., Hu, R., Lin, G. and Tang, Z. 2022. Construction of EMS-induced peanut mutant libraries and identification of pod-related traits mutant lines. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 92(2): 537-557. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.023912>.

- Cuadrado, I. M., Llamazares, R. M., Martínez, A. P. y García, R. P. 2009. Actividad alelopática de la cafeína en plántulas de trigo y lenteja. *Ambiociencias*. 4: 29-36.
- Cui, L., Hanika, K., Visser, R. G., and Bai, Y. 2020. Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea* spp.). *Agronomy*. 10(12): 1928. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121928>.
- de Melo, C. M. L., da Cruz Filho, I. J., de Sousa, G. F., de Souza, G. A., do Nascimento, D. K. D., da Silva, R. S., Rodrigues, B., de Lima, R. G., Alves, M. C. and de Moraes, G. J. 2020. Lignin isolated from *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162: 1725-1733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.003>.
- González, A. 2022. Caracterización morfoagronómica de variedades élite de *Coffea arabica* L. seleccionados participativamente con respuesta fenotípica al estrés abiótico. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas, México.
- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). Descriptors for coffee (*Coffea* spp. and *Psilanthus* spp.). Roma, Italia. 36 p. [Consultado 23 enero 2023] 1996. Disponible en https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/365.pdf.
- Ishibashi, K., Miura, Y., Wagatsuma, K., Toyohara, J., Ishiwata, K. and Ishii, K. 2022. Adenosine A2A Receptor Occupancy by Caffeine After Coffee Intake in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 37 (4): 853-857. <https://doi.org/10.1002/mds.28897>.
- Joya-Dávila, J.G. and Gutiérrez, F.A. 2020. Ethyl methanesulfonate as inductor of somaclonal variants in different crops. *Phyton*. 89(4): 835-850. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.013679>.
- Joya-Dávila, J. G., Ruiz-Sesma, B., Lecona-Guzmán, C. A., Ruiz-Lau, N., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rojas-Martínez, R. I. and Gutiérrez Miceli, F. A. 2023. Field phytoprotection of *Coffea arabica* mother plants, disinfection and callogenesis induction. *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i2.2707>.
- Loyola-Vargas, V.M., Avilez-Montalvo, J.R., Avilés-Montalvo, R.N., Márquez-López, R.E., Ga-laz-Ávalos, R.M. and Mellado-Mojica, E. 2016. Somatic Embryogenesis in *Coffea* spp. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer, Cham. pp 241-266. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_15.
- Luján-Hidalgo, M. C., Jiménez, L. A., Ruiz, N., Reyes, S. J. y Gutiérrez, F. A. 2020. Cambios bioquímicos en respuesta al ataque de roya en plantaciones de café. *Polibotánica*. 49(1): 149-160. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.49.10>.
- Mallick, M., Awasthi, O. P., Paul, V., Verma, M. K., and Jha, G. 2016. Effect of physical and chemical mutagens on leaf sclerophylly and stomatal characteristics of *Kinnow mandarin* mutants. *Indian Journal of Horticulture*. 73(2): 291-293. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-0112.2016.00063.3>.
- Mba, C., Afza, R., Bado, S., and Jain, S.M. 2010. Induced mutagenesis in plants using physical and chemical agents. *Plant cell culture: essential methods*. 20: 111-130.
- Mishra, M.K. 2019. Genetic Resources and Breeding of Coffee (*Coffea* spp.). In: Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*. Springer, Cham. pp. 475-515. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5_12.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-493. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Pawar, N., Pai, S., Nimbalkar, M., Kolar, F. and Dixit, G. 2010. Induction of chlorophyll mutants in *Zingiber officinale* Roscoe by gamma rays and EMS, *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(1): 406-411. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i5.4828>.
- Purent, N., Chen, B., Liu, X., Zhou, Y. and He, M. 2020. Effect of ethyl methanesulfonate on induced morphological variation in M3 generation of *Chrysanthemum indicum* var. Aromaticum. *HortScience*. 55(7): 1099-1104. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15068-20>.
- Reyes, S. J., Ramírez, M. L., Arias, C., Rodríguez, M. A., Lecona, C. A., Ruiz, V. M., González, D. and Gutiérrez, F. A. 2019. Morphometric and biochemical changes in *Agave americana* L. plantlets induced by ethyl methanesulfonate. *Phyton*. 88 (3): 277. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.06504>.
- Rime, J., Dinesh, M. R., Sankaran, M., Shivashankara, K. S., Rekha, A., and Ravishankar, K. V. 2019. Evaluation and characterization of EMS derived mutant populations in mango. *Scientia Horticulturae*. 254(1): 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.015>.
- Sanglard, N. A., Amaral, P. M., Sattler, M. C., de Oliveira, S. C., Cesário, L. M., Ferreira, A., Carvalho, R. C. and Clarindo, W. R. 2019. Indirect somatic embryogenesis in *Coffea* with different ploidy levels: a revisiting and updating study. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36(2): 255-267. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1511-9>.
- Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogués, S. and Lalanne, E. 2014. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Methods*. 10(5): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-5>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola 1980 a 2022. Gobierno de México. [Consultado 27 diciembre 2022] 2022. Disponible en En: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Suprasanna, P., Mirajkar, S. J., and Bhagwat, S. G. 2015. Induced Mutations and Crop Improvement. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, Nueva Delhi. pp 593-617. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_23.
- World Coffee Research. Las variedades de café arabica. 10940 SW Barnes Rd #334 Portland, OR 97225. 75 pp. [Consultado 23 enero 2023] 2019. Disponible en: <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/>.
- Zhang, N., Wang, S., Zhang, X., Dong, Z., Chen, F. and Cui, D. 2016. Transcriptome analysis of the Chinese bread wheat cultivar Yunong 201 and its ethyl methanesulfonate mutant line. *Gene*. 575(2): 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.002>.

Selección multimodelo en la estimación de los parámetros de crecimiento de la sardina crinuda azul *Opisthonema bulleri* en el sur del Golfo de California

Multi-model selection in growth parameters estimation of blue thread herring *Opisthonema bulleri* in the southern Gulf of California

Jorge Payan-Alejo¹, Mercedes Laura Jacob-Cervantes^{2*} y Guillermo Rodríguez-Domínguez¹

¹ Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen S/N, Mazatlán, Sinaloa, 82000, México.

² Centro Regional de Investigación Pesquera, Instituto Nacional de Pesca, Calzada Sábalo-Cerritos S/N. Contiguo Estero El Yugo, C.P. 82112, Mazatlán, Sinaloa, México.

RESUMEN

La sardina crinuda azul (*Opisthonema bulleri*) es parte de los desembarques comerciales de peces pelágicos menores del sur del Golfo de California; la pesquería está certificada como sostenible por Marine Stewardship Council. Los parámetros de crecimiento de esta especie son de gran interés en la evaluación y manejo de la pesquería del complejo *Opisthonema*. En este estudio, se generó un conjunto de datos de edad a la talla de 367 lecturas de otolitos de los años 2005 y 2015 para completar los meses del año calendario con información continua e inferir la periodicidad de formación de la marca de crecimiento. Se utilizó un enfoque de selección multimodelo en cinco submodelos especiales del modelo de Schnute generalizado, incluido uno equivalente al modelo de von Bertalanffy. El tipo de borde mensual de los otolitos sugiere una marca de crecimiento anual. Se identificaron seis grupos de edad (0-5 años), con una APE y CV de 4,5 y 2,9 % respectivamente. El análisis de edad a la talla del conjunto de datos con la selección multimodelo es una garantía de que el caso uno de Schnute es el mejor para describir y estimar los parámetros de crecimiento de *O. bulleri* del sur del Golfo de California.

Palabras clave: *O. bulleri*, edad, crecimiento, selección multimodelo.

ABSTRACT

The blue thread herring (*Opisthonema bulleri*) is part of the landing commercials of small pelagic fishes from the southern Gulf of California; the fishery is certified as sustainable by the Marine Stewardship Council. The growth parameters of this specie are of great interest in the assessment and management of *Opisthonema* complex fishery. In this study, a data set age-at-size was generated from 367 otolith reads from the years 2005 and 2015 to complete the monthly continuity of one year and infer the formation periodicity of the growth mark. A multi-model approach on five special submodels of the generalized Schnute model, including one equivalent to the von Bertalanffy model, was used. The monthly edge type of otoliths suggests an annual growth mark. Six age groups were identified (0 - 5 years), with an APE and CV of 4.5 and

2.9 %, respectively. The age-at-length analysis of the data set with multi-model selection is a guarantee that Schnute's case is the best to describe and estimate the growth parameters of *O. bulleri* from the southern Gulf of California.

Key words: *O. bulleri*, age, growth, multi-model selection.

INTRODUCCIÓN

En el litoral de Sinaloa, Nayarit y Jalisco, el grupo de pelágicos menores de mayor importancia comercial está constituido por tres especies de peces del género *Opisthonema* (*Opisthonema libertate*, *O. medirastre* y *O. bulleri*) que en conjunto se denominan sardina crinuda (Jacob-Cervantes, 2010). La sardina crinuda *Opisthonema* spp. es actualmente el segundo recurso pesquero más importante en el Golfo de California y se encuentra certificada como sustentable por la Marine Stewardship Council, pero la evaluación de cada una de las especies del conjunto sardina crinuda debe ser continua y sistemática, lo que incluye modelar el crecimiento para cada especie.

El crecimiento de los organismos se puede estimar mediante métodos indirectos y directos. Los métodos indirectos son una forma más rápida de estimar el crecimiento a través del análisis de frecuencias de tallas, mientras que en los métodos directos se requiere de realizar lecturas de edad en alguna estructura ósea, por lo que se presenta el análisis del crecimiento de *O. bulleri* a través de un método directo, el cual se realiza por primera vez en esta especie. En los peces la estructura ósea más utilizada para la determinación de la edad son los otolitos y en las especies *O. libertate* y *O. medirastre* ya se han usado para la asignación de la edad (Carmona y Alexandres, 1994; Ruiz-Domínguez y Quiñones-Velázquez, 2018; Payán-Alejo *et al.*, 2020a; 2020b), aunque en otros peces también se usan escamas, vertebras y espinas (Campana, 2001).

El modelo de von Bertalanffy ha sido históricamente utilizado para describir el crecimiento en peces, a pesar de que existen en la literatura otros modelos alternativos: Gompertz (1825), Logístico (Ricker, 1975), Schnute (Schnute, 1981). Con el nuevo paradigma de Selección e Inferencia Multimodelo (Burnham y Anderson, 2002; Katsanevakis, 2006; Beninger

*Autor para correspondencia: Mercedes Laura Jacob-Cervantes
 Correo-e: mechejacob@yahoo.com

Recibido: 4 de septiembre de 2022

Aceptado: 18 de junio de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023

et al., 2012) no es necesario elegir a priori un modelo para describir el crecimiento, sino que se pueden proponer una serie de modelos candidatos y elegir el que mejor describa el crecimiento basado en Criterio de Información de Akaike (AIC). Este criterio selecciona el mejor modelo que se ajusta a los datos observados con base a la verosimilitud del modelo y el concepto de parsimonia, eligiendo el modelo con el mejor ajuste, pero también el más sencillo.

Entre los modelos alternativos para describir el crecimiento, el de Schnute es considerado un modelo versátil y generalizado que incluye como casos especiales, los modelos históricos (Schnute, 1981). De los cuatro casos especiales de este modelo, pueden generarse al menos ocho curvas de crecimiento diferentes. Por lo que el uso del modelo generalizado de Schnute para describir el crecimiento aumenta la probabilidad de que el modelo real esté incluido en los modelos candidatos evaluados a través del paradigma de Selección e Inferencia Multimodelo

En este trabajo se aborda la modelación del crecimiento de *O. bulleri* en el sur del Golfo de California a través de la lectura de edad en otolitos y un procedimiento de selección multimodelo a partir de los casos del modelo Schnute como modelos candidatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de pesca de la flota sardinera -cuyo puerto de descarga es Mazatlán, Sinaloa- comprende desde Punta Ahome, Sinaloa hasta Bahía Banderas, Jalisco. Está delimitada en el polígono incluido entre la Latitud 20 - 27 ° N, la Longitud 105 - 110 ° W y a un máximo de 37 km mar adentro (Figura 1).

La información analizada procede de los muestreos biológicos de las capturas comerciales de la sardina crinuda, realizados por el personal del Programa de Pelágicos Menores del CRIAP Mazatlán, INAPESCA, AGRICULTURA.

Se tomaron muestras al azar de 12 kg de la captura total de un barco y se seleccionaron aleatoriamente diez individuos de cada intervalo de talla de 5 mm, a los que se les midió longitud patrón (mm), peso (gr), sexo, se les extrajeron los otolitos sagitta para la determinación de la edad y el primer arco branquial para la identificación taxonómica de acuerdo a los criterios de Berry y Barret (1963). Se eligieron los datos de los años 2005 en los meses de marzo a septiembre (n = 215) y en 2015 en los meses de enero a septiembre y noviembre a diciembre (n = 152), porque al agruparse se completa el ciclo anual de información continua (excepto octubre) con un mayor tamaño de muestra.

Se evaluó la validez de la estructura para determinar la edad por medio de la relación radio del otolito (RO) versus longitud patrón.

Los otolitos se limpiaron y se sumergieron en agua purificada durante cinco minutos y en seguida se tomaron fotos digitales con la ayuda de un microscopio estereoscopio Carl Zeiss (Stemi 508) equipado con una cámara AxioCam ERc 5s. Entonces se contó el número de bandas opacas y hialinas de cada otolito (Beckman y Howlett, 2013) por tres lectores de manera independiente.

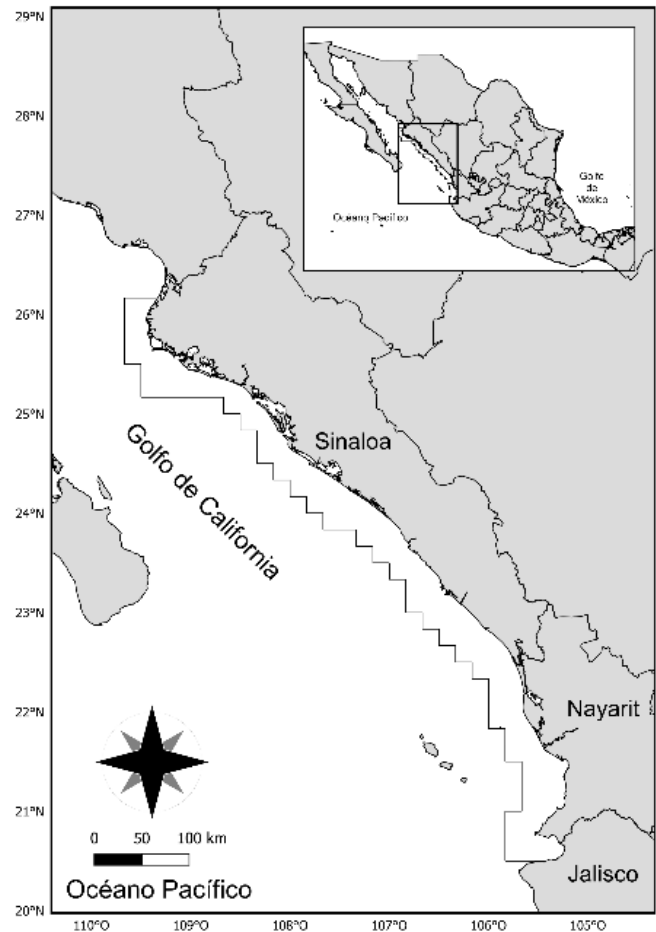


Figura 1. Área de pesca de la flota sardinera de Mazatlán.
Figure 1. Fishing area of thread herring from the Mazatlan Fleet.

Para estimar la precisión de las lecturas entre lectores se utilizó el error promedio porcentual (APE) (Beamish y Fournier, 1981) y el coeficiente de variación (CV) (Chang, 1982).

$$APE = 100 * \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \left[\frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{(X_{ij} - X_j)}{X_j} \right]$$

$$CV = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sqrt{\frac{\frac{1}{R} \sum_{i=1}^R (X_{ij} - X_j)^2}{R-1}} * 100$$

Dónde: N es el tamaño de muestra, R número de lecturas por estructura, X_{ij} es la *i*-ésima lectura de la *j*-ésima estructura, X_j es el promedio del número de marcas de crecimiento para la *j*-ésima estructura.

Cada par de bandas opacas y hialinas se consideró en un año de edad.

Para describir el crecimiento de *O. bulleri* con base a datos de edad - longitud patrón se evaluaron cinco casos del modelo de Schnute como se describen a continuación:

$$\text{Schnute caso 1, } a \neq 0 \text{ and } b \neq 0 Y(t) = \left[Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \frac{1 - e^{-\alpha(t-\tau_1)}}{1 - e^{-\alpha(\tau_2-\tau_1)}} \right]^{\frac{1}{b}}$$

Schnute caso 2, $a \neq 0$ and $b = 0$ $Y(t) = Y_1 \exp \left[\text{Log} \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{1 - e^{-\alpha(t-\tau_1)}}{1 - e^{-\alpha(\tau_2-\tau_1)}} \right]$

Schnute caso 3, $a = 0$ and $b \neq 0$ $Y(t) = \left[Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right]^{\frac{1}{b}}$

Schnute caso 4, $a = 0$ and $b = 0$ $Y(t) = Y_1 \exp \left[\text{Log} \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right]$

Schnute caso 5, $a > 0$ and $b = 1$ $Y(t) = \left[Y_1 + (Y_2 - Y_1) \frac{1 - e^{-\alpha(t-\tau_1)}}{1 - e^{-\alpha(\tau_2-\tau_1)}} \right]$

Donde: $Y(t)$ es longitud patrón a la edad t , Y_1 y Y_2 son la mínima y máxima longitud patrón, α es un parámetro de crecimiento con unidades de años, b está relacionado con el punto de inflexión de una curva de crecimiento en forma de "S" y τ_1 , τ_2 son la edad mínima y máxima del conjunto de datos. Los valores de a , b , Y_1 , Y_2 son los parámetros que fueron estimados durante el ajuste a los datos maximizando la función objetivo del logaritmo de la verosimilitud (Hilborn y Mangel, 1997) con el algoritmo de búsqueda de Newton (Neter et al., 1996).

$$LL = \left(-\frac{n}{2}\right) * (\ln(2\pi) + 2 * \ln(\sigma) + 1)$$

Donde: LL es el logaritmo de verosimilitud, n es el tamaño de muestra y σ es la desviación estándar, la cual se estimó con las siguientes funciones, considerando error aditivo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{t_i} - \hat{Y}_{t_i})^2}{n}}$$

Donde: Y_{t_i} es la longitud patrón observada, \hat{Y}_{t_i} es la longitud calculada y n el tamaño de muestra.

Una vez seleccionado el mejor modelo, se estimaron los intervalos de confianza de los parámetros por el procedimiento de perfiles de verosimilitud (Hilborn y Mangle, 1997).

Con el fin de evaluar los modelos candidatos y seleccionar el mejor, se adoptó la selección multimodelo (SMM), en donde varios modelos compiten y simultáneamente son confrontados con los datos (Johnson y Omland, 2004; Hobbs y Hilborn, 2006). Para tal efecto se utilizó el índice de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc, por sus siglas en inglés) que incorpora información sobre el ajuste, la complejidad del modelo y el tamaño de la muestra (Akaike, 1981; Burnham y Anderson, 2002, Johnson y Omland, 2004).

$$AIC = AIC + \frac{2K(K + 1)}{n - K - 1}$$

$$AIC = 2(K - LL)$$

Donde: n es el número total de observaciones, k es el número total de parámetros estimados y LL es la máxima logverosimilitud.

Para cada modelo la plausibilidad fue estimada con el peso de Akaike (PAIC) lo que indica la importancia de cada modelo en la descripción de la información observada.

$$PAIC = \frac{\exp(-0.5\Delta_i)}{\sum_{k=1}^n \exp(-0.5\Delta_i)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis entre el radio del otolito (RO) y la longitud patrón (LP) de *O. bulleri* muestra una relación lineal (Figura 2), con un coeficiente de correlación positiva y significancia ($r = 0.823$, $t = 21.4$ $p < 0.001$) que indica que el radio del otolito incrementa con el tamaño del pez; el coeficiente de determinación indica que el 67.8 % de la variación de la talla se explica por el tamaño del otolito, mientras que el 32.3 % es explicado por otro factor independiente. El crecimiento proporcional del otolito con respecto a la talla del pez es importante cuando se requiere hacer un retro-cálculo de tallas pretéritas y entre mayor precisión se tenga es mejor, especialmente porque en especies longevas se presenta reabsorción de anillos (Fenómeno de Lee), sin embargo, en este estudio no se realizó el retro-cálculo, debido a que se tuvieron bien representadas los organismos de las primeras edades. Los otolitos solo fueron examinados para observar las bandas de crecimiento hialinas y opacas, las cuales se pueden presentar independiente de la proporcionalidad del otolito con la talla del pez. Además, los otolitos ya se han usado para la determinación de edad en especies de *O. libertate* y *O. medirastre* (Carmona y Alexandres, 1994; Ruiz-Domínguez y Quiñones-Velázquez, 2018; Payán-Alejo et al., 2020a; 2020b), por lo que la determinación de la edad a través de otolitos en *O. bulleri* es fiable.

La estacionalidad en las capturas y discontinuidad en la aparición de *O. bulleri* durante los muestreos han dificultado la determinación de la edad, pero se logró completar una continuidad de once meses (excepto de octubre) con muestras de otolitos, para registrar mensualmente el tipo de borde del otolito (borde opaco y hialino), al agrupar los meses de los años 2005 y 2015. La mayor proporción mensual de otolitos con bordes opacos (banda de crecimiento rápido) se presentó de enero a abril y la menor proporción de junio a septiembre, mientras que los porcentajes de bordes hialinos

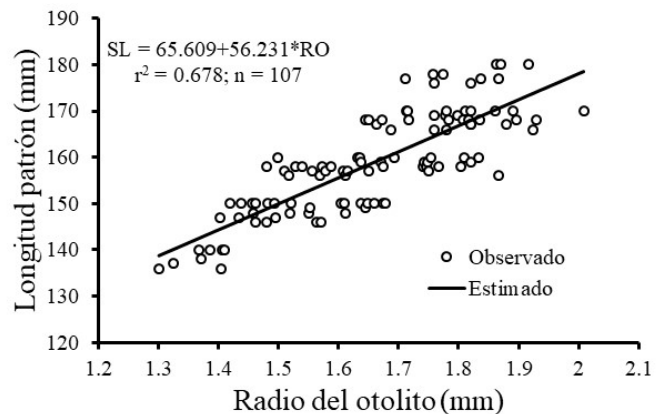


Figura 2. Relación radio del otolito (RO) versus longitud patrón de *O. bulleri*.
 Figure 2. Relationship of otolith radius (OR) versus standard length (SL) of *O. bulleri*.

(banda de crecimiento lento) presentaron una tendencia inversa. Esto sugiere que cada año se forma una banda opaca y una hialina, esta última en los meses de verano, pero puede variar interanualmente, dado que la proporción mensual del tipo de borde analizada en este trabajo representa un promedio de dos años (2005 y 2015). La periodicidad de la formación de la banda hialina de crecimiento anual concuerda con las descritas en las especies *O. libertate* y *O. medirastre* (Ruiz-Domínguez y Quiñónez-Velázquez, 2018; Payán-Alejo *et al.*, 2020a, b), lo que soporta los resultados obtenidos. La mayor proporción de bordes hialinos (banda de crecimiento lento) durante los meses de verano (Figura 3), se asocia a la actividad reproductiva de las especies del complejo *Opisthonema* que se presenta de mayo a agosto (Jacob-Cervantes, 2010), dado que los organismos destinan mayor energía a la maduración de las gónadas y disminuye el aporte energético destinado al crecimiento corporal.

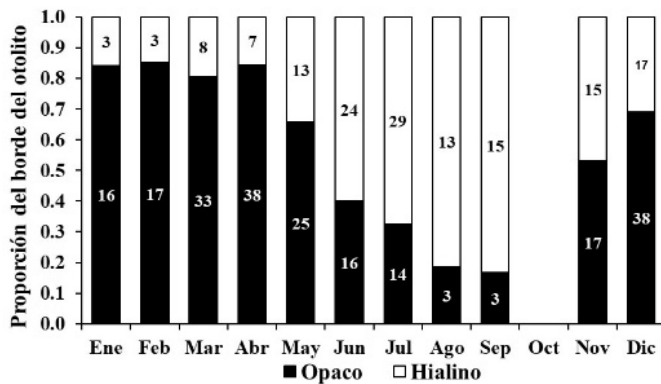


Figura 3. Proporción mensual del tipo de borde en los otolitos de *O. bulleri* del sur del golfo de California.

Figure 3. Monthly proportion of edge otoliths type in *O. bulleri* from the southern Gulf of California.

El conteo de bandas de crecimiento permitió conocer la estructura de edad de las capturas e identificar seis grupos de edad para *O. bulleri* (Figura 4). El APE y el CV de las lecturas fue 4.5 y 2.9 % respectivamente. Aunque no hay puntos de referencia para la precisión de lecturas de edad en los peces, los valores de ambos índices utilizados aquí, fueron menores a la mediana de los estudios de edad de 117 peces (APE = 5.5 %, CV = 7.6 %) y que fueron recomendados como límite máximo para organismos de vida corta (Campana, 2001). En estudios de edad en *O. libertate* y *O. medirastre* se obtuvieron valores de APE entre 2.7 y 4.8 % y un CV entre 2.4 y 6.1 % (Ruiz-Domínguez y Quiñónez-Velázquez, 2018; Payán-Alejo *et al.*, 2020a; 2020b). Los valores de APE y CV de este estudio indican entonces una lectura de edad aceptable de *O. bulleri*, al encontrarse entre los límites de APE y CV reportados para las especies *O. libertate* y *O. medirastre*.

Este es el primer trabajo sobre edad y crecimiento de *O. bulleri*, el principal inconveniente para la estimación de los parámetros de crecimiento en esta especie es la poca representatividad de organismos en el ciclo anual durante los muestreos. Vega-Corrales (2010) intentó estimar los pa-

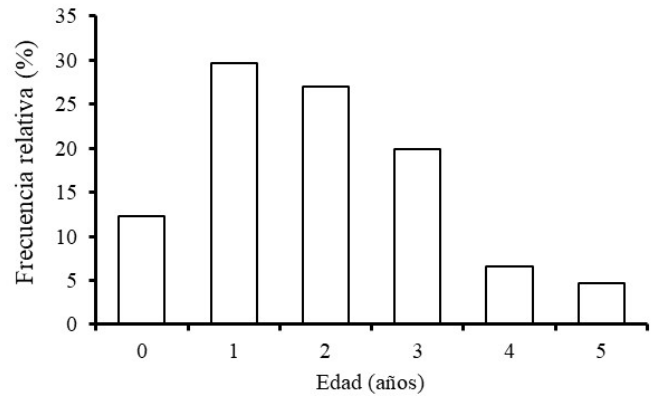


Figura 4. Frecuencia relativa de marcas de crecimiento de *O. bulleri* del sur del golfo de California.

Figure 4. Growth-marks relative frequency of *O. bulleri* from the southern Gulf of California.

rámetros de crecimiento de *O. bulleri* mediante el análisis de frecuencia de tallas, pero al encontrar poca representatividad de datos, sugirió que los parámetros de crecimiento eran poco confiables, debido a que existía alta probabilidad de obtener un sesgo importante en los valores estimados y optó por evitar inferir los parámetros de crecimiento de *O. bulleri*.

Al comparar los diferentes casos del modelo Schnute en la descripción del crecimiento de *O. bulleri*, el modelo Schnute caso 1 resultó el mejor, dado que obtuvo el menor AIC (2294.9) y con el soporte del PAIC = 100.0 % (Tabla 1), indica que este es un claro ganador (> 90 %) que puede describir adecuadamente el crecimiento de *O. bulleri*.

El principio de AIC en la selección multimodelo penaliza el número de parámetros de cada modelo para discrimina entre modelos simples y complejos. En este caso el modelo de Schnute caso 1 tiene un mayor número de parámetros, pero aun así fue el mejor modelo, ya que cuando se analizaron los modelos ajustados a los datos, se observó que el modelo Schnute caso 1 pasa por la parte central de los datos observados, a diferencia del resto de los modelos (Schnute caso 2, 3 y 5) que subestiman la talla para los datos observados en las edades avanzadas (Figura 5). En la tabla 1 se observa el orden jerárquico de los modelos (ΔAIC), en este análisis, el Schnute caso 5, que es el equivalente al modelo de crecimiento de von Bertalanffy, fue colocado en tercer lugar sin soporte en los datos, por lo que el uso a priori de este modelo tradicional para describir el crecimiento en *O.*

Tabla 1. Parámetros de crecimiento, AICc, ΔAIC y PAIC de los casos del modelo Schnute ajustados a los datos edad-talla de *O. bulleri*.

Table 1. AICc, ΔAIC and PAIC growth parameters of Schnute model cases fitted to data set age-at-size of *O. bulleri*.

Caso	Y_1	Y_2	a	b	AICc	ΔAIC	PAIC
1	125.53	202.65	-1.21	18.7	2294.9*	0	100
2	128.85	193.05	0.43	0	2383	88.17	0
3	126.61	194.6	0	5.2	2338.2	43.32	0
4	136.31	212.96	0	0	2543.9	249.09	0
5	128.47	193.55	0.34	1	2373.9	79.01	0
* Mejor modelo	$T_1 = 0.5$ $T_2 = 5.5$						

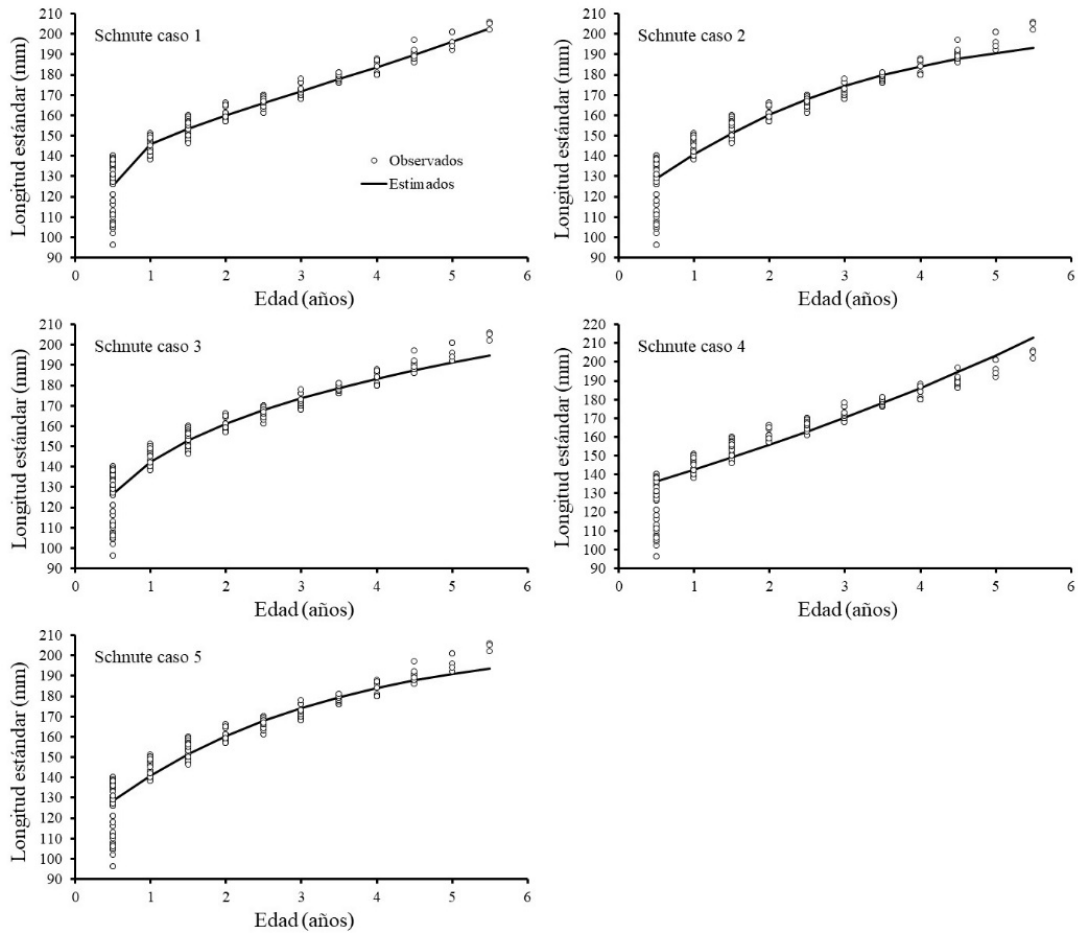


Figura 5. Curvas de crecimiento de *O. bulleri* del sur del golfo de California.
Figure 5. Growth curves of *O. bulleri* from the southern Gulf of California.

Tabla 2. Intervalos de confianza de los parámetros al 95 %.
Table 2. Parameters confidence intervals at 95 %.

Valor del Parámetro	Caso 1		Caso 2		Caso 3		Caso 4		Caso 5	
	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior
y_1	123.905	127.148	128.834	128.865	126.589	126.629	136.297	136.329	128.456	128.488
y_2	201.781	203.512	193.029	193.067	194.588	194.617	212.919	212.991	193.537	193.573
a	-1.241	-1.184	0.434	0.436	0	0	0	0	0.344	0.346
b	18.316	19.088	0	0	5.193	5.200	0	0	1	1

bulleri sería un error porque se podría perder información, por ejemplo, la diferencia entre la talla estimada entre el mejor modelo y el Schnute caso 5 en las edades de un año es 4.6 mm, mientras que en edades de cinco años las diferencias se incrementa hasta 9 mm.

En el análisis de los parámetros de crecimiento del mejor modelo Schnute caso 1 (Tabla 1), se observa que la sardina *O. bulleri* presenta un crecimiento acelerado en el primer año de vida, dado que alcanza una longitud patrón de 145.63 mm, que corresponde al 71.86 % del valor de talla máxima (y_2); sin embargo, *O. bulleri* es la especie de los tres componentes del complejo *Opisthonema* del sur del Golfo de California que presenta el crecimiento más lento comparado con *O. libertate*

y *O. medirastre* que alcanzan el 73.79 y 76.8 % respectivamente, al primer año de vida en relación a la talla máxima (y_2) (Payán-Alejo *et al.*, 2020a; 2020b).

CONCLUSIONES

Este trabajo es pionero para entender la dinámica poblacional de *O. bulleri* y las diferencias que pudieran existir entre las especies simpátricas del complejo *Opisthonema* spp. en el sur del Golfo de California. La caracterización del tipo de borde en los otolitos de los años 2005 y 2015 sugiere una marca hialina de crecimiento con periodicidad de formación anual. Se identificaron 6 grupos de edad; en los datos edad-talla analizados la selección multimodelo garantiza que el modelo

Schnute caso 1 es el mejor para estimar el crecimiento de *O. bulleri* del sur del Golfo de California.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal de Maz Sardina S.A. de C.V. por las facilidades otorgadas para el estudio de este recurso, al Programa de Pelágicos Menores del Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Mazatlán del INAPESCA, AGRICULTURA, por la obtención de la información, al Dr. Felipe Amezcua del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL, UNAM) por las facilidades otorgadas para la digitalización de imágenes. Al Consejo Nacional de Humanidades y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de Posgrado.

REFERENCIAS

- Akaike, H. 1981. Likelihood of a model and information criteria. *Journal of Economics*, 16: 3-14.
- Berry, D.H. y Barret, I. 1963. Gillraker analysis and speciation in the thread herring genus *Opisthonema*. *Bulletin of Inter-American Tropical Tuna Commission*, 7(2): 137-190.
- Beamish, R.J. y Fournier, D.A. 1981. A method for comparing the precision of a set of age determinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 982-983.
- Beckman, D.W. y Howlett, D.T. 2013. Otolith annulus formation and growth of two redhorse suckers (*Moxostoma*: *Catostomidae*). *Copeia*, 2013(3): 390-395.
- Burnham, K.P. y Anderson, D.R. 2002. *Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach*. Springer, New York.
- Campana, S.E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology*, 59: 197-242.
- Carmona, R. y Alexandres, F. 1994. Determinación del crecimiento de *Opisthonema libertate* (Clupeiformes: Clupeidae) mediante lecturas de otolitos. *Revista de Biología Tropical*, 42(1-2): 233-238.
- Chang WB. 1982. A statistical method for evaluating the reproducibility of age determinations. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39: 1208-1210.
- Hilborn, R. y Mangel, M. 1997. *The ecological detective. Confronting models with data*. Princeton, New Jersey.
- Hobbs, N.T. y Hilborn, R. 2006. Alternatives to statistical hypothesis testing in ecology: a guide to self-teaching. *Ecological Applications*, 16(1): 5-19. <https://www.jstor.org/stable/40061776>
- Johnson, J.B. y Omland, K.S. 2004. Model selection in ecology and evolution. *Trends Ecology and Evolution*, 19(2): 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.10.013>
- Katsanevakis, S. 2006. Modelling fish growth: model selection, multi-model inference, and model selection uncertainty. *Fisheries Research*, 81: 229-235.
- Katsanevakis, S. y Maravelias, C.D. 2008. Modelling fish growth: multi-model inference as a better alternative to a priori using the Von Bertalanffy equation. *Fish and Fisheries*, 9: 178-187.
- Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J. y Wasserman, W. 1996. *Applied linear statistical model*. McGraw-Hill, New York.
- Payán-Alejo, J., Jacob-Cervantes M.L. y Rodríguez-Domínguez, G. 2020a. Age and growth of thread herring *Opisthonema libertate*, in the southern Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 48(1):15-22.
- Payán-Alejo, J., Jacob-Cervantes M.L. y Rodríguez-Domínguez, G. 2020b. Age and growth of middling thread herring *Opisthonema medirastre* (Berry y Barrett, 1963) in the southern Gulf of California. *Revista Bio Ciencias*.7:1-13.
- Ruiz-Domínguez, M. y Quiñonez-Velázquez, C. 2018. Edad, crecimiento y mortalidad de *Opisthonema libertate* en las costas del noroeste de México. *Ciencias Marinas*, 44(4): 235-250.
- Schnute, J. 1981. A versatile growth model with statistically stable parameters. *California Cooperative Oceanic Fisheries*
- Vega-Corrales L.A. 2010. Evaluación poblacional del stock explotable del complejo *Opisthonema* (Pisces: Clupeidae) en el golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 2: 83-94.
- Von Bertalanffy, L. 1938. A quantitative theory of organic growth. *Human Biology*, 10: 181-213.

Caracterización morfológica y determinación de la diversidad genética de aguacate criollo *Persea americana* Mill de Parras, Coahuila

Morphological characterization and genetic diversity determination of the creole avocado *Persea americana* Mill in Parras, Coahuila

Lizeth Guadalupe Campos-Múzquiz¹, Patricia Guadalupe De León-García¹, Adriana Carolina Flores-Gallegos¹, Rocío Guadalupe Castillo-Godina¹, Raúl Rodríguez-Herrera^{1*}

¹ Afilación 1; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza 935, Colonia República, Saltillo 25280, Coahuila, México.

RESUMEN:

En México existen diferentes genotipos criollos de aguacate con gran valor genético, cultural y nutricional. En Parras, Coahuila el aguacate criollo *Persea americana* Mill es famoso por su sabor y rusticidad. Estos árboles podrían servir como fuente de germoplasma, sin embargo, no existen estudios científicos sobre su morfología y diversidad genética que establezcan su valor genético. En este estudio se muestrearon trece árboles de aguacate criollo. Se evaluaron características morfométricas de frutas y del árbol. Asimismo, se determinó la diversidad genética utilizando como marcadores moleculares, Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR). Los árboles mostraron variaciones en el tamaño, forma del árbol, circunferencia, patrón de ramificación y forma de la hoja. También las frutas presentaron diferencias morfológicas en tamaño, forma y semilla. El análisis de componentes principales indicó una fuerte asociación entre el tamaño de la semilla con la cavidad del fruto. Por otro lado, la población de árboles de aguacates criollo presentó una diversidad genética de 0.27, y el 78 % de los loci analizados presentaron polimorfismos. Además, se analizó la estructura de la población identificando dos subpoblaciones. En conclusión, los árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila son buenos candidatos como fuente de germoplasma debido a su alto valor genético.

Palabras clave: aguacate criollo, variabilidad genética, *Persea*, polimorfismo, marcadores moleculares

ABSTRACT

In Mexico, there are different creole avocado genotypes with great genetic, cultural, and nutritional value. In Parras, Coahuila, the *Persea americana* Mill creole avocado is famous for its flavor and rusticity. These trees could serve as a source of germplasm, however, there are no scientific studies on their morphology and genetic diversity that establish their genetic value. In this study, thirteen creole avocado trees were sampled. Morphometric characteristics of fruits and the trees were evaluated. Likewise, genetic diversity was determined using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) as molecular markers. Trees showed variations in size, tree shape, girth, branching pattern, and leaf shape. Fruits also showed morphological differences in size, shape, and seed. Principal component analysis showed a strong association between

seed size and fruit cavity. On the other hand, the population of creole avocado trees presented a genetic diversity of 0.27 and 78 % of the loci analyzed presented polymorphisms. In addition, the structure of the population was analyzed identifying two subpopulations of trees. In conclusion, creole avocado trees from Parras, Coahuila are good candidates as a source of germplasm due to their high genetic value.

Keywords: creole avocado, genetic variability, *Persea*, polymorphism, molecular marker

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor y exportador de aguacate (*P. americana* Mill) en el mundo (Arias *et al.*, 2018). De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en el 2021 la producción de aguacate en México alcanzó los 2,555,591 MT, siendo la variedad Hass, la de principal exportación (Osoyo, 2021). Sin embargo, en México existen otras variedades y genotipos, con menor relevancia económica, pero de alto valor cultural, nutricional y genético, siendo este país uno de los de mayor diversidad fenotípica del aguacate (Moreno *et al.*, 2010).

La diversidad fenotípica del aguacate está representada en la variación de caracteres como forma, color, tamaño y sabor de frutos y hojas, así como en su fenología (Acosta Díaz *et al.*, 2013). La diversidad genética presente en las poblaciones de aguacate se debe a que el aguacate produce una semilla sexual por fruta y la dicogamia favorece la polinización cruzada resultado en una progenie muy diversa (Lahav y Lavi, 2009).

En la ciudad de Parras, Coahuila, México, existen diversos árboles de aguacate criollo. Esta diversidad de árboles es mantenida principalmente como planta de traspatio; no obstante, aún existen algunos árboles de vida silvestre. La fruta de esta población se clasifica en aguacate negro (piel negra) y aguacate blanco (piel verde). Esta fruta se consume con todo y piel, tiene alto contenido graso y rara vez es comercializada fuera de esta localidad (Sánchez-Flores *et al.*, 2015).

En años recientes en el noreste de México, los árboles de aguacate criollo han ido desapareciendo debido al incremento en la urbanización, la deforestación y a la introducción de cultivo de variedades uniformes (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2015).

*Autor para correspondencia: Raúl Rodríguez Herrera
Corre-e: raul.rodriguez@uadec.edu.mx

Recibido: 14 de diciembre de 2022

Aceptado: 26 de abril de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023

Además, en Parras, los árboles de aguacate generalmente crecen sin que se les preste atención técnica, por lo que suelen ser afectados por diferentes plagas y enfermedades (Sánchez-Flores *et al.*, 2015).

Los individuos de esta población silvestre presentan variaciones en el tamaño, forma, tipo de semilla y contenido de la pulpa (mesocarpio). Sin embargo, el número de tipos diferentes de árboles criollos es aún un misterio, y no existe información científica acerca de las características morfológicas, ni de su genotipo que permitan clasificarlos, identificarlos y seleccionar los genotipos más sobresalientes. Por lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivo caracterizar fenotípicamente diferentes árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila, y determinar su variabilidad genética a través de las Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) como marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En la ciudad de Parras, Coahuila, no existe un censo del número de árboles de aguacate, por lo que es difícil de estimar su abundancia, pero creemos que hay al menos tres o cuatro árboles por vivienda. Por tal motivo, la ciudad se dividió en cuatro cuadrantes y se eligieron los 13 árboles más representativos de los diferentes cuadrantes. Estos árboles se identificaron, georreferenciaron, se les tomó las mediciones y se recolectaron frutos y hojas maduras y jóvenes durante los meses de julio a septiembre del 2021 (Tabla 1). Con la relación entre tamaño de muestra y diversidad se comprobó que el tamaño de muestra fue el adecuado (ver Resultados y Discusión).

Caracterización fenotípica de los árboles

Las variables morfológicas que se evaluaron en los árboles de aguacate criollo fueron: edad, extensión, altura, forma, textura de la superficie del tronco, circunferencia del tronco, patrón de ramificación, distribución de las hojas y forma de las hojas. Todas estas medidas se basaron en los descriptores varietales para aguacates recomendados por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) (IPGRI, 1995). La edad de los árboles fue proporcionada por los dueños de los lotes correspondientes. Las variables cuantitativas de las características morfológicas fueron analizadas por medio de componentes principales utilizando el programa InfoGen v.2011.

Caracterización fenotípica de la fruta

Las variables morfológicas evaluadas en los aguacates criollos fueron: forma, longitud, diámetro de la fruta, peso, longitud y diámetro de la semilla, longitud y diámetro de la cavidad de acuerdo con el IPGRI (1995). Se evaluaron cinco frutas de cada árbol. Los datos cuantitativos se analizaron mediante componentes principales y se calculó el coeficiente rho de Spearman para determinar la correlación de las variables. Para esto se utilizó el programa InfoGen v.2011.

Tabla 1. Localización de los árboles de aguacate criollo y variedad a la que pertenecen.

Table 1. Location of creole avocado trees and variety to which they belong.

ID árbol	Latitud	Longitud	Variedad
1	25.431061	-102.169	Negro
2	25.431061	-102.169	Negro
3	25.429882	-102.17	Negro
4	25.432285	-102.187	Blanco
5	25.42752	-102.174	Negro
6	25.424697	-102.17	Negro
7	25.432383	-102.169	Blanco
8	25.440083	-102.196	Negro
9	25.449405	-102.2	Negro
10	25.449405	-102.2	Negro
11	25.449405	-102.2	Negro
12	25.449405	-102.2	Negro
13	25.440238	-102.195	Negro

Extracción de ADN

Se seleccionaron aquellas hojas sin lesiones ni signos de enfermedad y se limpiaron con etanol al 70%. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de Dellaporta (1994). En breve, el tejido vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se molió utilizando un pistilo y mortero estériles. El polvo resultante se colocó en un microtubo de 2 mL. Se le agregó 600 μ L de Solución de Lisis I (200 mM NaCl, 2 % SDS, 1 % polivinilpirrolidona, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH8, 3 U proteinasa K y 2 % β -mercaptoetanol) se mezcló y se incubó 65 °C por 15 min. Después se agregaron 600 μ L de Solución de Lisis II (2 % CTAB, 1.4 M NaCl, 2 % polivinilpirrolidona, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH8, y 2 % β -mercaptoetanol), se agregaron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (CIA) (24:1) y se mezcló por inversión. El tubo se centrifugó a 13,300 g durante 10 min. La fase acuosa se lavó de nuevo con CIA. Se precipitó el ADN utilizando 0.6 volúmenes de isopropanol y 30 μ L de acetato de sodio 3 M. El ADN se lavó con etanol al 70% y se suspendió en TE (Tris- HCl 1 mM pH 6.4, EDTA 1 mM pH8). La integridad del ADN se evaluó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y cuantificado por medio de espectrofotometría a 260/280 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas EPOCH (BioTek). El árbol número 13 no fue analizado genéticamente, solo morfológicamente.

Amplificación de los ISSR

Se probaron siete iniciadores (Escobar-Saucedo *et al.*, 2022) bajo condiciones estándar de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Para cada reacción, los iniciadores se utilizaron a una concentración final de 2.5 μ M, dNTPs a 250 μ M, 2 mM $MgCl_2$, buffer 1x, 2 U de DNA polimerasa y 100 ng de DNA. Las condiciones de termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min, seguido por diferentes temperaturas de alineación dependiendo del iniciador (Tabla 2) y una extensión a 72 °C por 2 min.

Tabla 2. Iniciadores reportados por Escobar-Saucedo *et al.* (2022) utilizados en este estudio, sus temperaturas de alineación, así como el número de bandas obtenidas.

Table 2. Primers reported by Escobar-Saucedo *et al.* (2022), used in this study, their alignment temperatures, as well as the number of bands obtained.

Iniciador de ISSR	Secuencias (5'-3')	Temperatura de alineación (°C)	No. total de bandas
1	GAGAGAGAGAGAGATC	47.7	10
2	AGAGAGAGAGAGAGATC	49.7	10
3	CTCTCTCTCTCTCTAG	40	10
4	CTCCTCCTCCTCCTC	55	10
5	GAGAGAGAGAGAGAT	52	10
6	AGCAGCAGCAGCAGGA	51.9	0
7	TCTCTCTCTCTCTCC	44.1	0

Análisis genético

Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1.5 % y cada banda se consideró como un locus, codificando ausencia como 0 y presencia como 1.

El porcentaje de polimorfismos de ISSR, diversidad genética, heterocigosidad esperada (H_e), número efectivo de alelos y la muestra mínima requerida fueron calculados utilizando InfoGen v. 2011 (Balzarini y Di Rienzo, 2003). Para agrupar los diferentes genotipos evaluados, se construyó un dendrograma utilizando la distancia de Sokal Sneath 3 ($\sqrt{1-S}$) ya que con esta se obtuvo la correlación cofenética más alta.

La estructura genética se determinó con un análisis de coordenadas principales con los datos de los patrones de bandeado de ISSR utilizando el software InfoGen v. 2011 (Balzarini y Di Rienzo, 2003). Además, se realizó un análisis de conglomerados bayesiano para inferir la probabilidad de asignación individual a un número variable de conglomerados distintos, utilizando el software STRUCTURE 2.3.4 (Falush *et al.*, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009; Pritchard *et al.*, 2000). Se utilizó un enfoque de cadena de Markov Monte Carlo

(MCMC) para estimar el ajuste de datos a los grupos K. Las simulaciones se realizaron utilizando 10.000 repeticiones antes de comenzar a tomar los datos para el análisis, 100,000 iteraciones MCMC, y 10 repeticiones para cada K. Se seleccionó el número más probable de clústeres en función del valor máximo de ΔK siguiendo el método de Evanno utilizando STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl y Vonholdt, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenotipificación de los árboles

Se muestrearon un total de 13 árboles diferentes de aguacate criollo de Parras, Coahuila (Tabla 1). Las características morfológicas se presentan en la Tabla 3. El rango de edad varía de 5 a 47 años, siendo el árbol No.10 el más joven y el árbol No. 2 el más viejo. El árbol de mayor extensión es el No. 1 y el árbol de menor extensión es el No. 5. La forma de árbol predominante es de columna. La mayoría de los árboles presentaron textura de corteza lisa. La circunferencia del tronco varía de 41 a 201 cm. La mayoría de los árboles presentaron un patrón de ramificación extenso. La forma predominante de la hoja es ovalada. Todos los árboles presentaron ángulo de ramificación agudo y forma de base de hoja aguda. La mitad de los árboles tienen hojas ovaladas y la otra mitad hojas ovaladas-lanceoladas.

La forma columnar de los árboles, la altura promedio (8.27 m) y la circunferencia del tronco (112.69 m) concuerda con los árboles de aguacate criollo de Colombia evaluados por López-Galé *et al.* (2022). Sin embargo, el patrón de distribución de las ramas difirió con este autor, ya que en este estudio se presentaron patrones más diversos.

La circunferencia máxima del tronco fue menor que la presentada en Norcasia, Colombia, pero la circunferencia mínima del tronco concuerda con los árboles muestreados en los tres sitios de Colombia evaluados por López-Galé *et al.* (2022).

Tabla 3. Características morfológicas de los árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila.

Table 3. Morphological characteristics of creole avocado trees in Parras, Coahuila

ID árbol	Edad (años)	Extensión (m)	Altura (m)	Forma del árbol	Textura de la corteza	Circunferencia del tronco (cm)	Patrón de ramificación	Distribución de ramas	Forma de la hoja
1	20	7 x 5	7.3	Semiéptica	Rugosa	130	Ambas	Ascendente	Oblonga-lanceolada
2	47	5 x 4.5	7.9	Columna	Muy rugosa	190	Extensivo	Axial	Oval
3	27	5 x 4.5	6.1	Semicircular	Rugosa	122	Ambas	Vertical	Oval
4	18	4 x 3.5	8.9	Columna	Muy rugosa	204	Extensivo	Irregular	Oval
5	25	1.5 x 2	9.1	Columna	Lisa	81	Extensivo	Irregular	Oval
6	35	3.5 x 2.5	13.6	Columna	Lisa	190	Extensivo	Axial	Oblonga-lanceolada
7	10	1.5 x 2.5	11.4	Columna	Lisa	71	Extensivo	Axial	Oblonga-lanceolada
8	10	2 x 2	9.5	Columna	Lisa	49	Extensivo	Axial	Oblonga-lanceolada
9	21	4 x 4	9.1	Circular	Rugosa	156	Ambas	Irregular	Lanceolada
10	5	4 x 4	8.3	Piramidal	Lisa	140	Ambas	Irregular	Oval
11	7	2 x 1.5	4.8	Columna	Lisa	48	Extensivo	Vertical	Oval
12	18	2 x 1.5	6.2	Columna	Lisa	41	Extensivo	Axial	Oblonga-lanceolada
13	16	2 x 2.5	5.4	Columna	Lisa	43	Extensivo	Axial	Oblonga-lanceolada

Las frutas de aguacate criollo también fueron evaluadas. Dos árboles presentaron aguacate blanco y once, aguacate negro (Tabla 4). El color de la piel de la fruta no determinó las otras variables. La longitud promedio de la fruta fue de 6.88 ± 1.21 cm, el diámetro promedio de la fruta fue de 4.45 ± 0.64 cm, y el peso promedio del aguacate fue de 75.06 ± 23.66 . La longitud de la fruta coincide con los aguacates procedentes de Guerrero, México, y fueron más pequeños que los colombianos y los de Nuevo León; asimismo, el diámetro de la fruta de Parras fue menor comparada con la de Guerrero y Nuevo León (Acosta Díaz *et al.*, 2018; Damián-Nava *et al.*, 2017; López-Galé *et al.*, 2022). Las semillas fueron más pequeñas que las de los aguacates criollos mencionados por Damián-Nava *et al.* (2017). El peso promedio de la fruta fue menor que el reportado por Acosta Díaz *et al.* (2018) para la región de Nuevo León.

Se realizó un análisis de componentes principales utilizando las variables evaluadas y estandarizadas (Figura 1). Para esto, se utilizó una matriz de correlación para que las variables involucradas tuvieran la misma importancia (Van Hintum *et al.*, 2003). Se encontraron asociaciones positivas fuertes en algunas variables. Por ejemplo, la longitud de la cavidad, la longitud de la semilla y la longitud de la fruta indicando que, aunque las frutas tienen una gran longitud, también poseen semillas grandes, las cuales cubren toda la cavidad. Una situación similar sucede con respecto al diámetro de la fruta, el diámetro de la semilla y el diámetro de la cavidad.

Por otro lado, los árboles de aguacate fueron agrupados de acuerdo con sus características morfológicas cuantitativas a través de un análisis de conglomerados. Éste mostró que los árboles 8 y 9, 13 y 12, y 10 y 3, se encuentran estrechamente relacionados (Figura 2).

Tabla 4. Características morfológicas del aguacate criollo de Parras, Coahuila.

Table 4. Morphological characteristics of the creole avocado fruit in Parras, Coahuila.

ID árbol	Color de la fruta	Longitud fruta (cm)	Diámetro fruta (cm)	Peso (g)	Forma de semilla	Longitud semilla	Diámetro semilla	Longitud de cavidad	Diámetro cavidad
1	Negro	9.7 ± 0.4	4.1 ± 0.2	73.8 ± 8.1	Claviforme	6.0 ± 0.4	2 ± 0.4	7 ± 0.2	2.5 ± 0.2
2	Negro	7 ± 0.6	4.7 ± 0.2	74 ± 9.1	Obovado	4.3 ± 0.3	2.9 ± 0.1	4.5 ± 0.3	3 ± 0.1
3	Negro	6.8 ± 0.6	4.4 ± 0.2	70.4 ± 8.2	Obovado angosto	4.6 ± 0.3	3 ± 0.2	4.6 ± 0.3	3 ± 0.2
4	Negro	6.5 ± 0.5	4.5 ± 0.4	77 ± 13.6	Esferoide alto	3.8 ± 0.1	2.5 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.2 ± 0.4
5	Blanco	7 ± 0.74	4.8 ± 0.3	89 ± 20.2	Elipsoide	4.9 ± 0.5	3.4 ± 0.5	5.1 ± 0.6	3.4 ± 0.6
6	Negro	5.1 ± 0.6	3.8 ± 0.2	50.0 ± 14.5	Elipsoide	3.6 ± 0.5	2.6 ± 0.3	3.7 ± 0.5	2.6 ± 0.3
7	Blanco	7.1 ± 0.6	4.8 ± 0.2	89.6 ± 18.0	Esferoide alto	5.2 ± 0.5	3.4 ± 0.5	5.2 ± 0.5	3.4 ± 0.3
8	Negro	6.1 ± 0.3	4.3 ± 0.3	65.0 ± 6.9	Obovado	4.1 ± 0.2	3 ± 0.2	4.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2
9	Negro	7.5 ± 0.8	5.3 ± 0.5	113 ± 24.3	Obovado	4.6 ± 0.6	3.3 ± 0.4	4.8 ± 0.6	3.5 ± 0.3
10	Negro	5 ± 0.6	4.3 ± 0.4	42.8 ± 3.5	Esferoide	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.3
11	Negro	6.3 ± 1.1	2.9 ± 1.2	35 ± 10.4	Obovado angosto	3.6 ± 0.7	2 ± 0.2	4 ± 0.8	2.1 ± 0.3
12	Negro	7.2 ± 0.3	4.7 ± 0.5	83.8 ± 10.1	Esferoide	3.6 ± 3.4	3.1 ± 0.2	4.5 ± 0.4	3.3 ± 0.2
13	Negro	8.2 ± 0.4	5.4 ± 0.2	112.4 ± 14.8	Esferoide alto	3.7 ± 0.3	2.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	3.3 ± 0.1

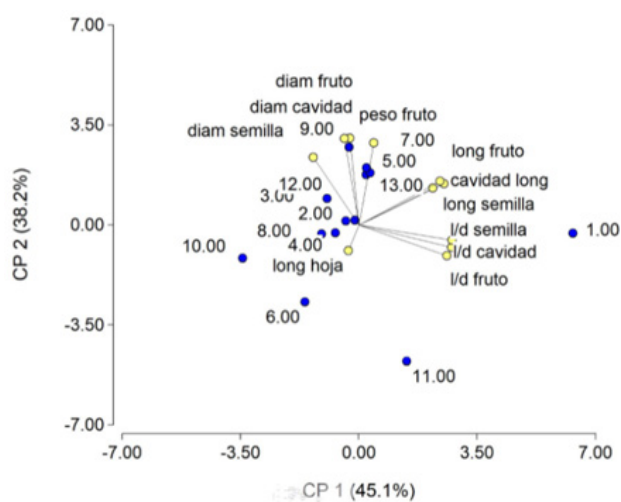


Figura 1. Análisis de componentes principales basado en variables morfológicas cuantitativas de árboles de aguacates criollos (en número de identificación).

Figure 1. Principal components analysis based on quantitative morphological variables of creole avocado trees (by ID number).

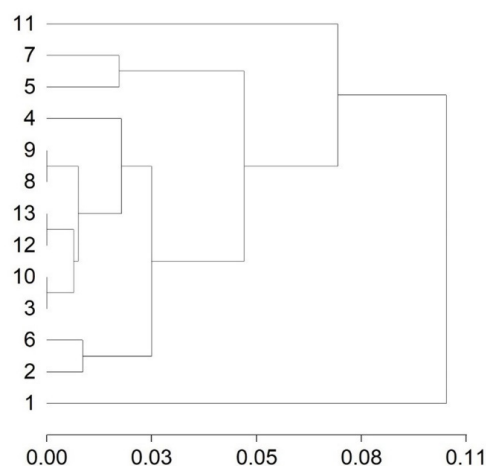


Figura 2. Análisis de conglomerados de los árboles de aguacate criollo (en número de identificación) basado en características morfológicas cuantitativas.

Figure 2. Cluster analysis of criollo avocado trees (in number ID) based on quantitative morphological characteristics.

Variabilidad genética

En este estudio se utilizaron siete iniciadores, pero solo cinco amplificaron con el ADN de los árboles de aguacate criollos muestreados (Tabla 2). Se amplificaron un total de 50 loci, 10 bandas por iniciador. Este número fue similar al obtenido por López-Guzmán y Palomino (2021) en árboles de aguacate criollo de Nayarit, donde amplificaron de 12 a 17 bandas por ISSR. De la misma manera, los resultados son similares a los presentados por Gutiérrez-Díez *et al.* (2015) para los árboles de aguacate criollo en Nuevo León; pero se identificaron menos loci que los reportados por Reyes-Alemán *et al.* (2018) para árboles de aguacate de diferentes partes de México, en los cuales obtuvieron de 20 a 34 loci por ISSR, sin embargo, en este estudio se utilizaron iniciadores degenerados, lo cual aumenta la probabilidad de obtener más amplicones.

El análisis genético mostró que el 78 % de los loci presentaron polimorfismos, con un promedio de alelos de 1.78, un número efectivo de alelos de 1.46 y 87 alelos en total. Este nivel de polimorfismo es similar al presentado en árboles de aguacate criollo de Tecuala, Nayarit, con un polimorfismo de 78.05 % (López-Guzmán y Palomino, 2021). La población de árboles de aguacate criollo de este estudio presentó una diversidad genética de Nei de 0.27, un índice de Shannon de 0.40 y una heterocigosidad esperada (H_e) de 0.29. Estos valores se encuentran dentro de lo esperado para aguacates criollos ya que los árboles de aguacate criollo de Nayarit tienen una H_e promedio de 0.25 utilizando marcadores moleculares ISSR (López-Guzmán y Palomino, 2021). No obstante, la H_e en este estudio es menor que la de árboles de aguacate criollo de Nuevo León, ya que presentaron una H_e de 0.48 (Sánchez-González y Gutiérrez-Díez, 2020).

Para asegurar que el número de árboles muestreados fue el suficiente para determinar la variabilidad genética de la población se determinó el número mínimo de muestra requerida. La Figura 3 muestra que la cantidad de árboles

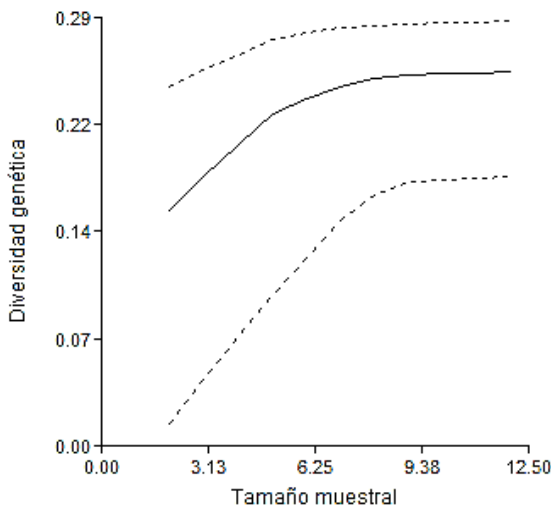


Figura 3. Determinación de la muestra mínima con un re-muestreo de 100 árboles.

Figure 3. Determination of the minimum sample with a re-sampling of 100 trees.

analizados fue suficiente para determinar la diversidad genética de la población, y que un número mayor de árboles muestreados no alteraría el resultado obtenido.

Con los datos de los loci identificados se generó un dendrograma para encontrar semejanzas y diferencias entre los árboles de aguacate. La distancia utilizada fue Sokal Sneath 3, ya que con esta se obtuvo la correlación cofenética más alta (0.866) (Figura 4). Se pueden identificar tres grupos, sin embargo, la distancia entre ellos es mayor al 60 % indicando que los árboles son genéticamente diferentes entre sí (Balzarini *et al.*, 2006). Esto discrepa del agrupamiento generado con las características morfológicas. Lo anterior podría deberse a que las características morfológicas se encuentran codificadas en loci específicos mientras que los ISSR son multilocus, distribuidos a lo largo de todo el genoma. Además, es posible que los ISSR utilizados no estén vinculados a genes codificantes para características morfológicas. Este tipo de discrepancia ya se había observado antes en árboles de aguacate de Tanzania donde los agrupamientos por morfología y genotipo determinados por SSR fueron diferentes (Juma *et al.*, 2021).

Inferencia de la estructura poblacional

Se realizó un análisis de coordenadas principales para mostrar las relaciones definidas por las distancias o similitudes en un espacio de baja dimensión. El análisis del biplot explicó el 52 % de la variabilidad, la coordenada principal 1 explicó el 35.1 % de la variabilidad, mientras que la coordenada 2 explicó el 17.6 % (Figura 5). En general, se pueden observar dos grupos de genotipos. No obstante, estos agrupamientos no son específicos por lo que se realizó un análisis de conglomerados bayesiano para asignar los árboles de aguacate a un conglomerado específico.

La inferencia de distintas subpoblaciones dentro de la población de estudio utilizando el programa STRUCTURE

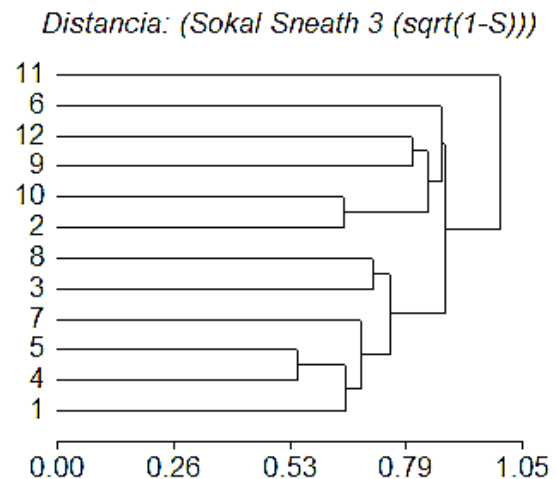


Figura 4. Dendrograma obtenido de la matriz de distancia basado en el índice de similitud Sokal Sneath 3. Transformación: raíz cuadrada del complemento a uno de la semejanza.

Figure 4. Dendrogram obtained from the distance matrix based on Sokal Sneath 3 similarity index. Transformation: square root of the complement to one of the similarity.

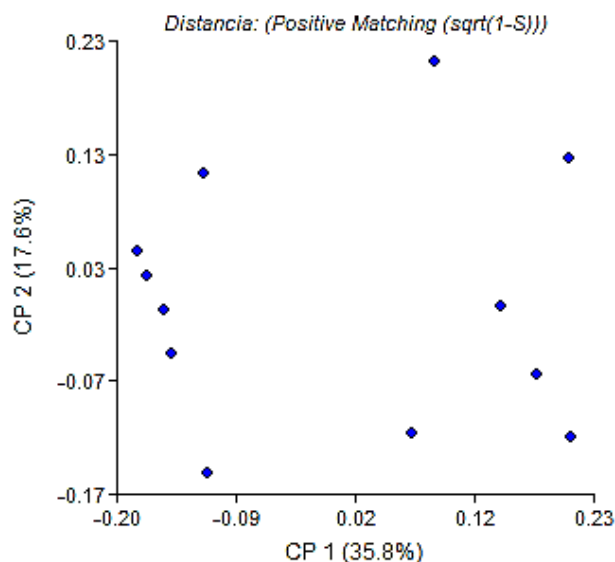


Figura 5. Análisis de coordenadas principales de árboles de aguacates criollos, la clasificación se realizó utilizando los marcadores moleculares ISSR. El algoritmo utilizado fue emparejamiento positivo.

Figure 5. Analysis of principal coordinates of creole avocado trees, the classification was carried out using the ISSR molecular markers. The algorithm used was positive matching.

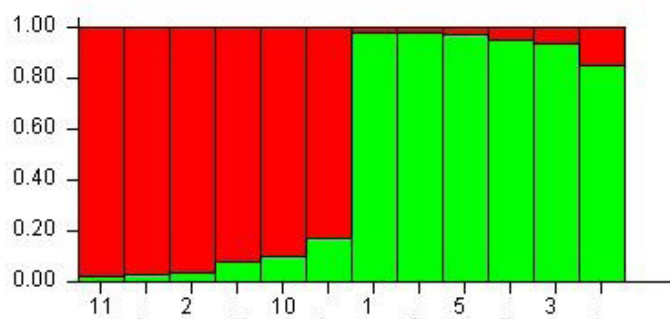


Figura 6. Asignación de los árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila a una población. Cada individuo está representado por una sola línea vertical dividida en conjuntos de colores. La longitud del color en líneas verticales representa la proporción de pertenencia a cada uno de los dos grupos inferidos en cada individuo. Cada número corresponde a la identificación del árbol.

Figure 6. Population assignment of creole avocado trees from Parras, Coahuila. Each individual is represented by a single vertical line divided into sets of colors. The length of the color in vertical lines represents the proportion of belonging to each of the two groups inferred in each individual. Each number corresponds to the identification of the tree.

mostró que la población de árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila, se divide en dos grupos (Figura 6), donde el 80.91 % de los árboles fueron asignados a un grupo con 95 % de confianza. Estos resultados indican que a pesar de que los árboles presentan grandes diferencias genéticas (Figura 4), se pueden clasificar en dos grupos diferentes.

CONCLUSIONES

En este estudio se realizó el primer acercamiento a la diversidad morfológica y genotípica de la población de árboles de aguacate criollo de Parras, Coahuila. Se logró caracterizar fenotípicamente la población. En el caso de las características fenotípicas de los árboles, no existe gran diversidad. En cuanto a la fruta, existen fuertes asociaciones entre el tamaño de la fruta, el tamaño de la cavidad y el tamaño de la semilla. No obstante, esto no concuerda con lo encontrado en el análisis genético, en el cual se caracterizó genotípicamente a los árboles, mostrando una alta diversidad genética, y se encontró la presencia de dos subgrupos poblacionales. Esta discrepancia entre el fenotipo y el genotipo podría deberse a que los marcadores moleculares evaluados no están vinculados a genes codificantes para las características morfológicas evaluadas. Sería necesario evaluar más árboles y más loci para establecer una relación entre fenotipo y genotipo. Esta es la primera vez que se analizan morfológica y genéticamente los árboles de aguacate criollo de Parras. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que esta población es un buen candidato como fuente de germoplasma para futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores externan su agradecimiento al "Fondo Destinado a Promover el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, en el Estado de Coahuila" ("FONCYT"), por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto COAH-2021-C15-C042 "Concientización sobre la importancia de los recursos genéticos del aguacate en Parras, Coahuila".

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Acosta Díaz, E., Almeyda León, I. H. y Hernández Torres, I. 2013. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4: 531-542.
- Acosta Díaz, E., Hernández Torres, I. y Almeyda León, I.H. 2018. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región sur. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 245-257.
- Arias, F., Montoya, C., y Velásquez, O. 2018. Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*. 55: 22-35.
- Balzarini, M. y Di Rienzo, J. 2003. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Balzarini, M., Arroyo, A., Bruno, C. y Di Rienzo, J. 2006. Análisis de Datos de Marcadores. XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luis. Argentina.
- Damián-Nava, A., Palemón-Alberto, F., Moreno-Juárez, J., Hernández-Castro, E., Damián-Díaz, P.E., Vargas-Álvarez, D. y Reyes-García, G. 2017. Characterization of creole avocado fruits harvested from both central and northern regions of Guerrero, Mexico. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 4: 151-159.

- Dellaporta, S. 1994. Plant DNA Miniprep and Microprep: Versions 2.1–2.3 BT - The Maize Handbook. En: Freeling, M., Walbot, V. (ed.), pp. 522–525. Springer New York, New York.
- Earl, D. y Vonholdt, B., 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4: 359-361.
- Escobar-Saucedo, M. A., Castillo-Reyes, F., Aguilar, C. N., Vázquez-Ramos, J. A., y Rodríguez-Herrera, R. 2022. Apple mutant trees with low chilling requirements: Proximal, genetic and DNA methylation analyses. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 43: 102413.
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164: 1567-1587.
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*. 7: 574–578.
- Gutiérrez-Díez, A., Sánchez-González, E., Torres Castillo, J.A., Cerda Hurtado, I. y Ojeda-Zacarias M. 2015. Genetic Diversity of Mexican Avocado in Nuevo Leon, Mexico. En: *Molecular Approaches to Genetic Diversity*. M. Caliskan, G. C. Oz, H. Kavakli y B. Ozcan (ed.), pp 141-159. InTech, Croacia.
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., Pritchard y J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*. 9: 1322-1332.
- IPGRI. 1995. *Descriptores para aguacate (Persea spp.)*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma.
- Juma, I., Geleta, M., Hovmalm, H. P., Nyomora, A., Saripella, G. V., Carlsson, A. S., Fatih, M. y Ortiz, R. 2021. Comparison of morphological and genetic characteristics of avocados grown in Tanzania. *Genes*. 12: 1-21.
- Lahav, E., Lavi, U. 2009. Avocado Genetics and Breeding. En: *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. A. Mohan y P.M. Priyadarshan (ed.) pp. 247-285. Springer New York, New York.
- López-Galé, Y., Murcia-Riaño, N., Romero-Barrera, Y. y Martínez, M.F. 2022. Morphological characterization of seed-donor Creole avocado trees from three areas in Colombia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 28: 93-108.
- López-Guzmán, G. G. y Palomino, Y. A. 2021. Diversidad genética del aguacate criollo en Nayarit, México determinada por ISSR. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 22: 1-14.
- Moreno, S., Rocha, A., Alvarado, M., Salgado, M. y Pinson, E. 2010. Aguacate: variedades, cultivo y producción en Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
- Osoyo, A., 2021. Report Name: Avocado Annual. Rept. MX2021-0060. United States Department of Agriculture. Ciudad de México.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Reyes-Alemán, J.C., Serrano-Hernández, M., Mejía-Carranza, J., Vázquez-García, L.M., Urbina-Sánchez, E., Valadez-Moctezuma, E. Barrientos-Priego, A. y Espíndola-Barquera, M. de la C., 2018. A genetic diversity study of *Persea*. *Acta Horticulturae*. 1203: 147-154.
- Sánchez-Flores, Ó.Á., García-Martínez, O., Myartseva, S.N., Ruiz-Cancino, E. y Carapia-Ruiz, V. 2015. Parasitismo natural de Aphelinidae (Hymenoptera) sobre *Aleuropleurocelus* aff. *acaudatus* Drews & Sampson (Aleyrodidae), en aguacates criollos del sur de Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 31: 173-177.
- Sánchez-González, E. y Gutiérrez-Díez, A., 2020. Outcrossing Rate and Genetic Variability in Mexican Race Avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 145: 53-59.
- Van Hintum, T.J.L., Brown, A.H.D., Spillane, C. y Hodgkin, T., 2003. Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. IPGRI Boletín Técnico. Roma.

Caracterización estructural y funcional de nanopartículas de ZnO-EPS sintetizadas a partir de exopolisacáridos producidos por *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG

Structural and functional characterization of ZnO-EPS nanoparticles synthesized from exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG

Diana Patricia Méndez-Díaz¹, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli¹, Lucía María Cristina Ventura-Canseco¹, Miguel Abud-Archila¹, Benjamín Valdez-Salas², María Candelaria Morales-Ruiz¹, María Celina Luján-Hidalgo^{1*}

¹ Tecnológico Nacional de México/IT. de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana km 1080, C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

² Universidad Autónoma de Baja California/Instituto de Ingeniería, Calle de la Normal s/n Colonia Insurgentes Este, C.P. 21280, Mexicali, Baja California, México.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) can be used as reducing agents and stabilizers, improving the physical and chemical properties of metallic nanoparticles. This study aimed to synthesize and evaluate the physicochemical, structural, and functional characteristics of ZnO particles obtained from EPS produced by *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG. The structural characterization of the EPS exhibited a high molecular weight structure composed mainly of mannose and glucose, possibly linked by α -1-4, α -1-3, α -1-6 according to the RMN spectrum. The increase in EPS concentration during the synthesis leads to an increase of particle size at micrometric scale, decreasing the polydispersity index. The synthesis was confirmed with a UV-vis spectral scan, while the FT-IR spectrum showed absorption peaks at 600 cm^{-1} associated with the Zn-O bond. Synthesized nano (NP) and microparticles (MP) showed improved functional characteristics comparing to free EPS. The highest values of antioxidant activity (80.25 %), water holding capacity (3.06 g H₂O/g sample), emulsifying activity (69.85 %), and flocculant activity (69.07 %) were obtained from MpZnO-EPS synthesized with a concentration of 6 mg/mL of the reducing agent. Bacteriostatic activity was observed against *S. aureus* and *L. fabifermentans*. The absence of hemolysis confirms the biocompatibility of the particles.

Keywords: Particles, zinc oxide, exopolysaccharides, *Lactiplantibacillus*.

RESUMEN

Los exopolisacáridos (EPS) pueden ser utilizados como agentes reductores confiriendo mejores propiedades físicas y químicas a las nanopartículas metálicas. Este estudio tuvo como objetivo sintetizar y evaluar las características fisicoquímicas, estructurales y funcionales de nanopartículas de ZnO producidas con EPS de *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG. La caracterización estructural de los EPS exhibió una estructura de alto peso molecular compuesta principalmente de manosa y glucosa con enlaces α -1,4, α -1,3, α -1,6 de acuerdo con el espectro de RMN. El aumento de la concentración de EPS en la síntesis provoca el incremento en el tamaño de las

partículas en escala micrométrica disminuyendo el índice de polidispersidad. La síntesis de las nanopartículas se confirmó mediante un barrido espectral UV-vis y el espectro FT-IR mostró picos de absorción a 600 cm^{-1} asociados al enlace Zn-O. Las nano (NP) y micropartículas (MP) sintetizadas mostraron actividades funcionales mejoradas respecto al EPS libre. Los valores máximos en actividad antioxidante (80.25 %), capacidad de retención de agua (3.06 g H₂O/g muestra), actividad emulsionante (69.85 %) y actividad floculante (69.07 %) se obtuvieron con las MpZnO-EPS sintetizadas con 6 mg/mL del agente reductor. La actividad bacteriostática fue observada contra *S. aureus* y *L. fabifermentans*. La ausencia de hemólisis confirmó la biocompatibilidad de las partículas.

Palabras clave: Partículas, óxido de zinc, exopolisacáridos, *Lactiplantibacillus*.

INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo de la nanotecnología ha captado el interés de la comunidad científica mundial debido a las propiedades únicas de las nanopartículas como son el tamaño reducido, mayor área superficial, cristalinidad, entre otras; además de haber demostrado aplicaciones como agentes antimicrobianos, antioxidantes y catalíticos (Abinaya *et al.*, 2018). La diversidad de aplicaciones de las nanopartículas metálicas en diversos campos ha resultado muy atractiva para el sector alimentario, el cual constantemente requiere de innovación y mejora en sus productos. Las nanopartículas de ZnO se han convertido en una de las nanopartículas de óxido metálico más novedosas en aplicaciones biológicas, así como, en recubrimientos, pigmentos y aditivos alimentarios, además, por su excelente biocompatibilidad y baja toxicidad (Bajpai *et al.*, 2018). La funcionalidad de las nanopartículas depende en gran medida de sus características, las cuáles son adquiridas o mejoradas a través del control de propiedades como el tamaño, química superficial y distribución. Es por ello que, los métodos de síntesis son determinantes para obtener nanopartículas con características deseables y homogéneas (Jo *et al.*, 2015). La síntesis verde a base de extractos vegetales se ha destacado sobre el uso de otros

*Autor para correspondencia: María Celina Luján-Hidalgo
Correo-e: maria.lh@tuxtla.tecnm.mx

Recibido: 25 de enero de 2023, Aceptado: 4 de Julio de 2023,
Publicado: 1 de septiembre de 2023

agentes reductores, debido a la fácil disposición del material vegetal, alto contenido de compuestos reductores y su bajo costo. Sin embargo, tiene la desventaja de producir nanopartículas polidispersas, lo anterior como consecuencia de la amplia diversidad de compuestos fitoquímicos, lo cual limita principalmente su aplicación biológica (Salunke *et al.*, 2014). Por ello, los agentes reductores de origen microbiano están recibiendo un especial interés y de forma particular, los exopolisacáridos bacterianos. Dichas matrices poliméricas (exopolisacáridos) confieren mejores propiedades físicas y químicas a las nanopartículas metálicas ya que tienen una composición estructural homogénea, dado que se producen bajo condiciones controladas (Ates, 2015). Los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido-lácticas (BAL) reconocidos como seguros (GRAS), representan un potencial biotecnológico. Además, destacan por sus propiedades funcionales sobresalientes como agentes estabilizantes, emulsionantes, floculantes, por su capacidad de retención de agua, así como, por su actividad antioxidante y antimicrobiana, y en conjunto, con las propiedades sobresalientes de las nanopartículas de ZnO, podrían potencializar su funcionalidad. Las cepas del género *Lactiplantibacillus* son reconocidas por ser productoras de exopolisacáridos (Silva *et al.*, 2019). Previamente, se ha reportado el aislamiento de la cepa de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, una cepa aislada de una bebida autóctona del estado de Chiapas en México, que ha presentado propiedades de interés como resistencia a antibióticos, supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, además de una destacada producción de EPS (Ramírez-Pérez *et al.*, 2022). Por ello, en la presente investigación se planteó, sintetizar nanopartículas de ZnO empleando exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG como agente reductor y estabilizador, para evaluar las características estructurales y funcionales de las nanopartículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Las cepas de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG y *S. aureus* fueron obtenidas del cepario del Tecnológico Nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México). Todos los reactivos y estándares usados fueron grados analíticos obtenidos de Sigma Aldrich. Los medios de cultivo empleados fueron adquiridos de Difco™. El kit para la determinación de hemoglobina glicada (Ref. TK43090) fue adquirido de SPINREACT. Los aceites comerciales fueron adquiridos en un supermercado local.

Obtención de los exopolisacáridos de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG

Lpb. fabifermentans BAL-27-ITTG se obtuvo del cepario del Laboratorio de Investigación del Tecnológico Nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez. La cepa fue reactivada realizando un inóculo del cultivo (10 % v/v) en caldo MRS (BD Difco™, EUA), seguido de una incubación a 36 °C (IEC- 42c Lumistell, MX), con agitación constante a 200 rpm (Max Q200 Thermo Scientific™, EUA). Una vez reactivada la cepa, se rea-

lizó el cultivo en biorreactor de tanque agitado (Z611000310 Applikon, Holanda) bajo condiciones controladas (pH 6 ± 0.1, 36 °C, 200 rpm) por 8 h en caldo MRS (Gutiérrez-Sarmiento *et al.*, 2020). Posteriormente, el caldo obtenido fue centrifugado (Z-236K Hermle, Alemania) a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C para separar la biomasa. El sobrenadante con EPS fue tratado con etanol absoluto en una relación 3:5 (v/v) y se dejó reposar durante 12 h a 4 °C. Para separar los EPS, la mezcla fue centrifugada (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y el precipitado obtenido fue dispersado en 40 mL de agua destilada, se adicionó etanol en una relación 1:1 (v/v) y se dejó reposar por 12 h a 4 °C. La solución fue centrifugada (4500 rpm, 30 min a 4 °C) y los EPS precipitados se dispersaron en agua destilada de acuerdo con las condiciones antes descritas. Posteriormente, ácido tricloroacético al 80 % (v/v) fue adicionado en una relación 10 % (v/v) a la solución de EPS y se dejó reposar durante 4 h a 4 °C. La solución final fue centrifugada (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y el sobrenadante con EPS se ajustó a pH 7 con NaOH 3 M, para después añadir 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar por 12 h a 4 °C. La solución final se centrifugó (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y los EPS se congelaron y liofilizaron para análisis posteriores (Yilmaz y Simsek, 2020).

Caracterización estructural de los exopolisacáridos de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG

Contenido de monosacáridos por HPLC

La composición de monosacáridos de los EPS se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (Serie 200 Perkin Elmer, EUA) con detector de índice de refracción (HPLC-IR) siguiendo la metodología reportada por Seedeve *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se dispersaron 50 mg de EPS en 1 mL de agua destilada al cual se le adicionaron 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4 M. La mezcla se calentó (Cimarec™ Thermo Scientific™, EUA) durante 3 h a 100 °C. Posteriormente, la mezcla se secó (Cimarec™ Thermo Scientific™, EUA) a 50 °C para eliminar el TFA. La muestra hidrolizada se resuspendió en 1 mL de agua destilada grado HPLC y se inyectaron 20 µL al HPLC. Se empleó una columna amino kromasil 100-5-NH₂. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo:agua (90:10 v/v) a un flujo de 1 mL/min en modo isocrático durante 60 min a 40 °C. La identificación de los azúcares se realizó por comparación de los tiempos de retención con estándares de ramnosa, glucosa, fructosa, xilosa, manosa y galactosa (Sigma Aldrich, EUA).

Determinación del peso molecular de los EPS

El peso molecular de los EPS fue calculado mediante la determinación de la viscosidad intrínseca [η] según Azim *et al.* (2018). Para lo cual se preparó una solución estándar de EPS (0.1 % p/v) en NaCl (0.1 M). A partir de la solución estándar se prepararon diluciones entre 0.01 - 1.00 (mg/mL) a las cuales se les determinó la viscosidad empleando un reómetro (HR-2 TA Instruments Discovery, EUA) de geometría de plato paralelo (40 mm de diámetro) con espacio (gap) de 1000 µm a 25 °C y a una velocidad constante de 62.1 s⁻¹. La viscosidad relativa n(rel) se calculó con la Ecuación 1, la viscosidad espe-

cífica $n(\text{sp})$ con la Ecuación 2 y la viscosidad reducida $n(\text{red})$ con la Ecuación 3.

$$n(\text{rel}) = \frac{n(\text{solución})}{n(\text{solvente})} \quad (1)$$

$$n(\text{esp}) = n(\text{rel}) - 1 \quad (2)$$

$$n(\text{red}) = \frac{n(\text{esp})}{c} \quad (3)$$

Resonancia magnética nuclear de ^1H y FT-IR

Para determinar la configuración de los enlaces glucosídicos presentes en la estructura del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, el análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Murru (2021), para lo cual se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear (DD2 Agilent, EUA) de 500 MHz. El análisis se realizó a 25 °C usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Así mismo, la técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) se empleó para identificar los grupos funcionales presentes en la molécula del EPS.

Síntesis de nanopartículas de ZnO-EPS

Para la síntesis de las nanopartículas de ZnO-EPS (NpZnO-EPS) se emplearon como agentes reductores los EPS extraídos evaluando su efecto a tres concentraciones diferentes (1, 3 y 6 mg/mL) en las características físicas de las nanopartículas (NPs) y en sus propiedades funcionales. Para lo cual se preparó una solución de ZnSO_4 0.1 M y se mezcló con el agente reductor en una relación 35:15 v/v. La solución obtenida se ajustó a pH 9 con NaOH 3 M agitando vigorosamente durante 10 min y se esterilizó en autoclave (CV 300 AESA, MX) durante 1 h a 15 lb/in². Posteriormente, la solución se centrifugó (4500 rpm, 20 min, 4 °C) y las nanopartículas precipitadas se lavaron 2 veces con etanol absoluto (50 mL) y con agua destilada (50 mL), centrifugando después de cada lavada. Las nanopartículas precipitadas se resuspendieron en agua destilada y se secaron a 40 °C (Sathiyarayanan *et al.*, 2017).

Caracterización de las NpZnO-EPS

La síntesis de las NpZnO-EPS se confirmó realizando un barrido espectral (200-800 nm) en un espectrofotómetro UV-Vis (DU-730 Beckman Coulter, EUA) según Estudillo-Díaz *et al.* (2023). El análisis espectral FT-IR se registró a una resolución de 500 a 4000 cm^{-1} utilizando un espectrómetro FT-IR (Nicolet iS10 Thermo Scientific, EUA), para identificar la vibración del enlace Zn-O. El tamaño hidrodinámico de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) (Abinaya *et al.*, 2018).

Funcionalidad de las NpZnO-EPS

Capacidad de retención de agua (CRA) de las NPZnO-EPS

La CRA se evaluó siguiendo la metodología reportada por Jiang *et al.* (2021) con algunas modificaciones. 75 mg de NpZnO-EPS se disolvieron en 1.5 mL de agua tridestilada. Posteriormente, las muestras se agitaron vigorosamente durante 10 min y fueron centrifugadas (10000 rpm, 15 min, 4 °C). El sobrenadante se separó y se pesó el precipitado de muestra húmeda. La CRA se calculó de acuerdo con la Ecuación 4:

$$CRA \left(\frac{g \text{ H}_2\text{O}}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso total de muestra seca}} \quad (4)$$

Actividad floculante (AF) de las NPZnO-EPS

La AF de las NpZnO-EPS se determinó preparando soluciones de NpsZnO-EPS y del EPS libre a 1 mg/mL ajustando a pH 8 con NaOH 1 M. Cada mezcla fue sonicada (08855-10 Cole-Parmer, EUA) por 30 min a temperatura ambiente y frecuencia de 40 Hz. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de cada solución de NpZnO-EPS, 0.5 mL de CaCl_2 (0.007 M) y 8 mL de carbón activado (6 mg/mL). La mezcla se agitó durante 2 min y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia a 550 nm del sobrenadante se determinó según Patil *et al.* (2011). La calibración del espectrofotómetro (DU-730 Beckman Coulter, EUA) se realizó usando una solución 1:1 (v/v) de CaCl_2 y H_2O destilada a pH 8 ajustado con NaOH 1 M. Como blanco se usó una mezcla de 0.5 mL de CaCl_2 , 8 mL de carbón activado y 0.5 mL de H_2O destilada. Los resultados se reportaron como porcentaje de floculación (Ecuación 5).

$$AF (\%) = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} * 100 \quad (5)$$

Actividad antioxidante de las NPZnO-EPS

La capacidad de captación de radicales DPPH de las NpZnO-EPS se determinó de acuerdo con Li *et al.* (2014) para lo cual se prepararon soluciones de nanopartículas de ZnO-EPS y de EPS libre (1 mg/mL) las cuales se ajustaron a pH 2 con HCl 1 M. Una alícuota de 1 mL de solución de DPPH metanólico (5×10^{-5} M) se mezclaron con 2 mL de las soluciones de NpZnO-EPS y EPS libre. Las soluciones se mezclaron (VORTEX 3 IKA, CHN) vigorosamente y se incubaron por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 517 nm. Los resultados fueron calculados con la Ecuación 6:

$$\text{Actividad antioxidante} (\%) = \left[1 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{\text{Abs control}} \right] * 100 \quad (6)$$

Dónde:

Abs_{muestra}: 1 mL de DPPH + 2 mL de la solución de NPZnO-EPS

Abs_{blanco}: 2 mL de la solución de EPS + 2 mL de metanol

Abs_{control}: 1 mL de DPPH + 2 mL de metanol

Actividad antimicrobiana de las NPZnO-EPS

La actividad antimicrobiana de las NpZnO-EPS se determinó de acuerdo con la metodología reportada por Solorzano-Toalá *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Cultivos microbianos de *S. aureus* ATCC 35556 y *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG fueron sembrados en agar nutritivo (BD Difco™, EUA) y Agar MRS (BD Difco™, EUA), respectivamente. Tras el crecimiento, se tomaron asadas de las colonias microbianas para resuspenderlas en agua peptonada, se tomaron alícuotas de 0.1 mL de cada cultivo y se inocularon masivamente en cajas Petri con agar nutritivo y agar MRS, respectivamente. Posteriormente, se colocaron discos de papel filtro estériles de 10 mm de diámetro y se agregaron 0.02 mL de solución de EPS libre, ZnSO₄ y NpZnO-EPS a concentraciones de 0.5, 0.75, 1 y 1.5 mg/mL a pH 4.5 (ajustado con HCl 1 M) para mejorar la dispersión de las nanopartículas. Las cajas petri fueron incubadas durante 48 h a 36 °C. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo las zonas de inhibición (mm).

Actividad emulsionante (AE) de las NPZnO-EPS

Para determinar la AE de las NpZnO-EPS, diversos aceites comerciales grado alimenticio con composiciones variantes de ácidos grasos fueron empleados. Se prepararon soluciones de NpZnO-EPS al 1.5 % (p/v) y se adicionaron 2 mL de cada aceite. Posteriormente, las suspensiones fueron agitadas en un vórtex (VORTEX 3 IKA, China) durante 5 min. La AE se calculó a la 1, 24 y 48 h (Kavitake *et al.*, 2020) lo que permitió determinar la estabilidad de la emulsión. Los resultados fueron calculados de acuerdo con la siguiente Ecuación 7:

$$AE (\%) = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total de la mezcla}} * 100 \quad (7)$$

A las 24 y 48 h se tomó una alícuota (0.1 mL) de la emulsión y fue observada al microscopio óptico con la lente de objetivo 40x.

Citotoxicidad de las NPZnO-EPS

La citotoxicidad de las NpsZnO-EPS se determinó evaluando el porcentaje de hemólisis en muestras de sangre humana (Khan *et al.*, 2015). El ensayo hemolítico fue realizado con un kit comercial (Spinreact, España) para determinación de hemoglobina glicada (HbA_{1c}). Una muestra de 5 mL de sangre fue utilizada para cada ensayo al cual se le adicionó 1.5 mg de EDTA/mL de sangre para su estabilización y conservación. Una solución de nanopartículas resuspendidas (0.03, 0.15, 0.3 mg/mL), ZnSO₄ (0.15 mg/mL) y EPS libre (0.3 mg/mL) fueron puestas en contacto con la muestra de acuerdo con las instrucciones del kit comercial y se determinó la absorbancia a 660 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de hemólisis (Ecuación 8):

$$\text{Hemólisis} (\%) = \frac{\text{Hemoglobina sin tratamiento} - \text{Hemoglobina tratada}}{\text{Hemoglobina sin tratamiento}} * 100 \quad (8)$$

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. La prueba de Tukey se utilizó para evaluar la diferencia entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans*

El rendimiento de exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG fue 375.64 ± 0.025 mg/L. Como es reportado, la producción y composición del EPS son influenciadas fuertemente por las condiciones de cultivo: como temperatura, pH y la composición del medio de cultivo en términos de fuente de carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas (Zisu y Sha, 2003). El rendimiento de exopolisacáridos para diversas especies de *Lpb. plantarum* se ha reportado en el rango de 31 a 859 mg/L producidos en medio de cultivo MRS (Jurasková *et al.*, 2021). Sin embargo, optimizando las condiciones de cultivo, empleando caldo MRS suplementado con sacarosa (23 g/L), pH de 7.4 y tiempos de cultivo de 48 a 50 h se han reportado rendimientos de hasta 1380 ± 0.06 mg/L y 1070 ± 0.01 mg/L para *Lpb. plantarum* YO175 y OF101 respectivamente (Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018). Por lo que, es posible obtener mejores rendimientos para *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG optimizando las condiciones de cultivo.

El análisis de la composición de monosacáridos realizado por HPLC indicó que el EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG es un heteropolisacárido compuesto por fracciones de manosa, glucosa, xilosa, ramnosa y fructosa. Dicha composición está determinada por la variación genética, la actividad enzimática que cataliza la biosíntesis, así como, por las condiciones de cultivo según lo reportaron Zisu y Sha (2003). Los heteropolisacáridos de bacterias ácido-lácticas en general comparten unidades repetitivas de monosacáridos, principalmente manosa y glucosa como se evidencia en cada una de las especies reportadas comparadas con el EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

En el espectro FT-IR del exopolisacárido de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG (Figura 1), se observaron bandas características a 3282 y 2936 cm⁻¹, asociadas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y C-H respectivamente. La banda de absorción a 1661 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de estiramiento del grupo C=O. La banda a 1338 cm⁻¹ se asocia a la vibración del ángulo variable del enlace C-H (Zhang *et al.*, 2021). En la zona de huella dactilar la región comprendida de 1200 a 900 cm⁻¹ se asocia a vibraciones de enlaces glucosídicos (-COC enlace glucosídico éter, -CO alcohol primario, C1-H carbono anomérico), especialmente de α-piranosidos (Leonia *et al.*, 2013). En la región anomérica (950-700 cm⁻¹) el pico de absorción a 828 cm⁻¹ está relacionado con enlaces β-glucosídicos que se asocia con la presencia de β-D-glucanos y las bandas de absorción cercanos a 804 cm⁻¹ también sugieren la presencia de manosa (Zhang *et al.*, 2021). La presencia de dichos grupos funcionales confirma la presencia

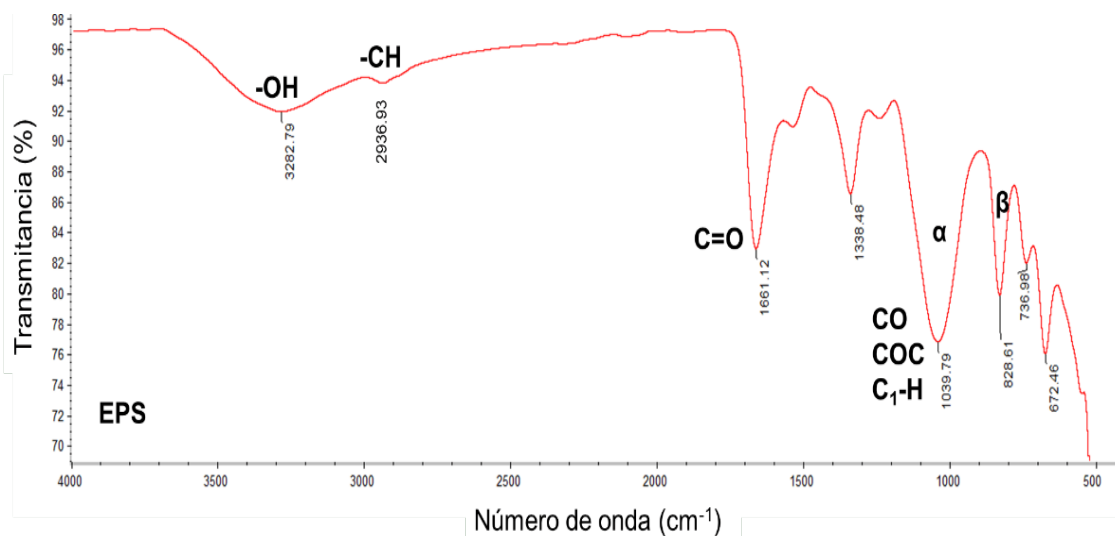


Figura 1. Espectro FT-IR del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.
Figure 1. FTIR spectrum of EPS produced by *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

de monosacárido con poder reductor para la síntesis de las nanopartículas.

El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H sugiere la posible configuración de los enlaces glucosídicos presentes en los EPS producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG. En la Figura 2 se observan señales de protones anoméricos en la región de desplazamiento químico (δ) entre 4.4-5.25 ppm, confirmando la presencia de polisacáridos (Zhang *et al.*, 2021). Se ha reportado, que la configuración α generalmente aparece a (δ) 4.8-5.6 ppm y la configuración β en δ 4.4-4.8 ppm (Senturk *et al.*, 2019). Para especies de *L. plantarum* se ha reportado que los desplazamientos químicos en 4.9, 5.07 y 5.2 ppm se asocian a enlaces α -1,6, α -1,3 y α -1,4 respectivamente (Senturk *et al.*, 2019), lo que sugiere la posible presencia de estos enlaces en la estructura del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG. Por otro lado, el despla-

zamiento químico comprendido entre 4.4-4.5 ppm del espectro de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, puede asociarse a enlaces β -glucosídicos o grupos oximetilo. Alvarado (2015) reportó que en el espectro de ^1H -RMN para β -glucanos, los desplazamientos químicos de 3.3-4.5 ppm corresponden a enlaces β -1,6, por lo que las señales entre (δ) 4.4-4.5 ppm del espectro de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG podrían ser más afines a enlaces β -glucosídicos. La señal intensa que se presenta entre 4.6 y 4.8 ppm en el espectro de ^1H -RMN se debe al disolvente empleado CDCl_3 (Alvarado, 2015).

Finalmente, el peso molecular promedio (Mw) determinado de manera indirecta por la viscosidad aparente $[\eta]$ medida experimentalmente (1.3 ± 0.7), dio como resultado un peso molecular promedio de 2.7 ± 0.57 MDa, el cual se encuentra dentro del intervalo reportado para bacterias ácido lácticas que van desde pesos moleculares de 10^4 a 10^6 Da y

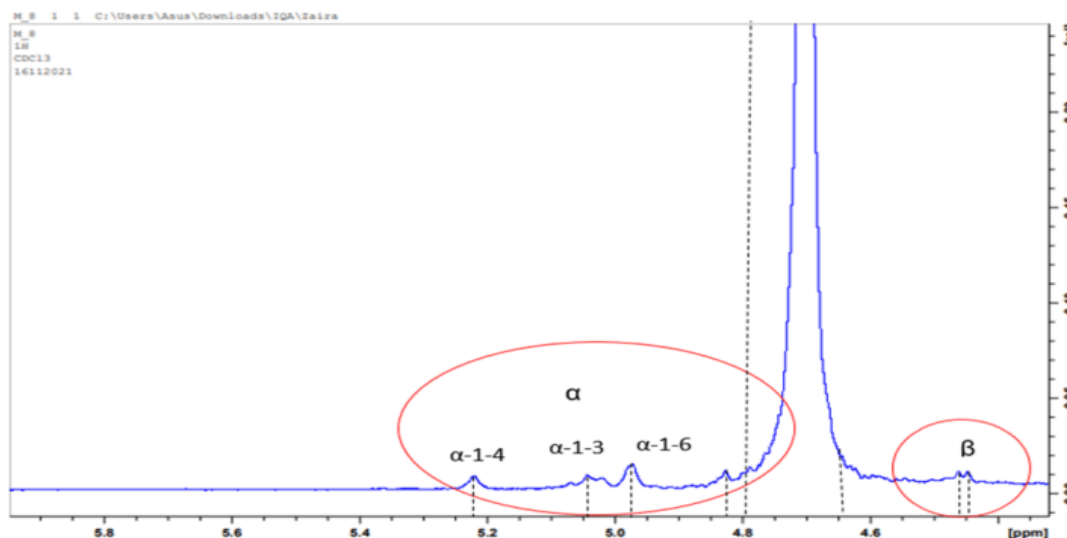


Figura 2. Espectro RMN- ^1H del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.
Figure 2. RMN- ^1H spectrum of EPS produced by *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

clasificándose como un EPS de alto peso molecular (Ismail y Nampoothiri, 2014).

Caracterización de las nanopartículas ZnO-EPS

La síntesis verde de NpZnO-EPS se evidenció mediante la aparición de una suspensión coloidal de color blanco (Abinaya *et al.*, 2018). El barrido espectral UV-Vis de la solución coloidal confirmó la formación de las NpZnO-EPS observándose el desplazamiento de las bandas de absorción en un rango de 315 - 440 nm con un máximo de absorción a 375 nm, lo cual es consistente con las bandas de absorción características para las nanopartículas de ZnO (Figura 3) (Jayachandran y Nair, 2021). Estas bandas se han atribuido al efecto de resonancia de plasmón superficial, ya que las nanopartículas metálicas tienen electrones libres que producen una banda de absorción generada por la vibración mutua de los electrones de las nanopartículas en resonancia con la onda de luz. El pico de absorción del EPS libre se observó a 295 nm y se asocia con transiciones electrónicas $n-\sigma^*$ y/o $\pi-\pi^*$, que se encuentran en los grupos funcionales como carboxilo, carbonilo y éster asociados a los grupos funcionales de los EPS (Trabelsi *et al.*, 2019).

Por otra parte, los óxidos metálicos generalmente exhiben bandas de absorción en la región IR por debajo de 1000 cm^{-1} (Mahamuni *et al.*, 2019). Las vibraciones de estiramiento del enlace Zn-O de las NPs sintetizadas con EPS de *Lpb. fabifermentas* mostraron vibraciones de estiramiento a 596, 601 y 600 cm^{-1} correspondientes a las nanopartículas sintetizadas con 1, 3 y 6 mg/mL de EPS, respectivamente. Las diferencias en el número de onda y frecuencia pueden deberse a los tamaños de las nanopartículas según lo reportaron Chithra *et al.* (2015).

El efecto de la concentración del EPS como agente reductor y estabilizador en la síntesis de NpZnO-EPS, se reflejó en el tamaño hidrodinámico de las NPs, así como, en el índice de polidispersidad (PDI). El PDI disminuyó significativamente conforme aumentó la concentración de EPS en la síntesis de las partículas de ZnO (Tabla 1), obteniéndose una distribución de tamaños homogénea (Figura 4). Los resultados indi-

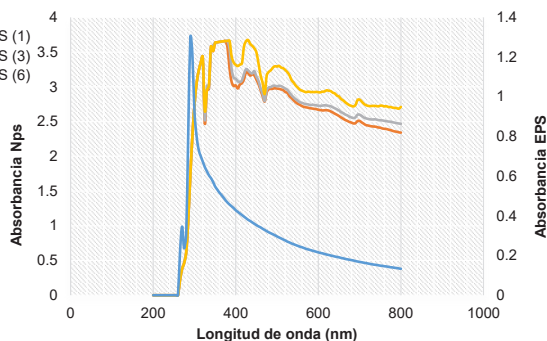


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de ZnO-EPS. Las NpZnO-EPS (1), NpZnO-EPS (3), NpZnO-EPS (6) corresponden a las nanopartículas sintetizadas con EPS a 1, 3 y 6 mg/mL respectivamente.

Figure 3. ZnO-EPS nanoparticles UV-Vis absorption spectrum. NpZnO-EPS (1), NpZnO-EPS (3), NpZnO-EPS (6) correspond to EPS-synthesized nanoparticles at 1, 3 and 6 mg/mL respectively.

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI) de las partículas de ZnO-EPS.

Table 1. Hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of ZnO-EPS particles.

Tratamiento	Muestra (%)	Diámetro hidrodinámico (μm)	PDI
NpZnO-EPS (1 mg/mL)	65	0.00962 ± 0.00264	$2.630a \pm 1.68$
MpZnO-EPS (3 mg/mL)	100	1.92 ± 0.397	$0.053b \pm 0.009$
MpZnO-EPS (6 mg/mL)	100	1.43 ± 0.235	$0.050b \pm 0.003$

Letras diferentes por columna tienen diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

can, que las concentraciones de EPS (3 y 6 mg/mL) formaron micropartículas (MpZnO-EPS). Por otro lado, el aumento en el diámetro hidrodinámico de escala nano a micropartículas podría atribuirse a la adsorción de macromoléculas (EPS) sobre la superficie de las partículas que tienden a aumentar el tamaño hidrodinámico aparente (RH) de las partículas. Este aumento podría estar asociado al espesor de las macromoléculas adsorbidas (Lim *et al.*, 2013).

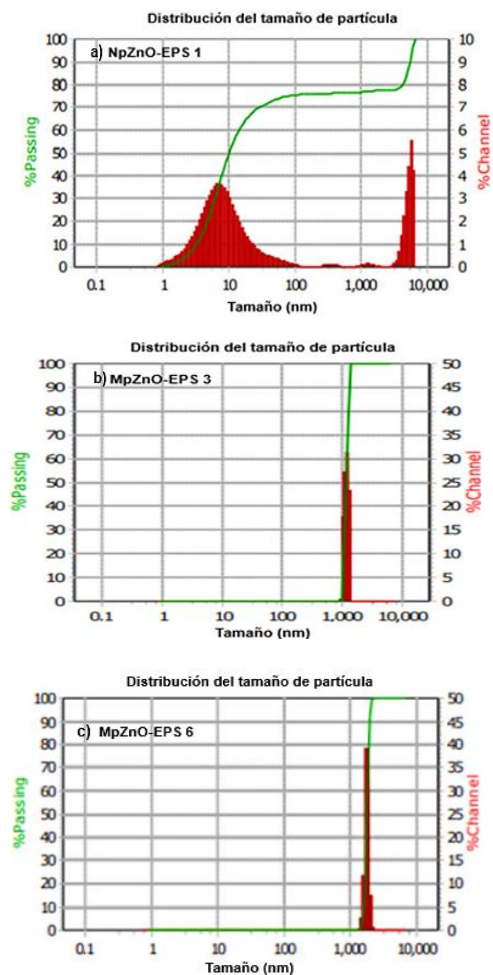


Figura 4. Distribución de tamaño de partículas. a) Nanopartículas sintetizadas con EPS a 1 mg/mL, b) Micropartículas sintetizadas con EPS a 3 mg/mL, c) Micropartículas sintetizadas con EPS a 6 mg/mL.

Figure 4. Particle size distribution. a) EPS-synthesized nanoparticles at 1 mg/mL; b) EPS-synthesized nanoparticles at 3 mg/mL; c) EPS-synthesized nanoparticles at 6 mg/mL.

Capacidad de retención de agua (CRA) de las NpZnO-EPS

La CRA es considerada una de las propiedades funcionales esenciales en el procesamiento de alimentos, ya que está directamente relacionada con la textura a través de las interacciones entre los componentes, incluidos el agua y el aceite. De acuerdo con los resultados obtenidos, conforme aumenta la concentración de EPS (1, 3 y 6 mg/mL) como agente reductor de las NPZnO-EPS, incrementa significativamente la CRA (Tabla 2) comparado con la CRA del EPS estructura libre. Los resultados mostraron que conforme va disminuyendo el PDI en las nanopartículas, la dispersión de tamaños se vuelve más controlada y las partículas se vuelven mucho más activas debido al crecimiento del área de superficie total con ello el número de centros activos y su funcionalidad (Suchomel *et al.*, 2018). Los resultados muestran que las micro y nanopartículas de ZnO tienen mejor CRA, comparado con la pectina comercial, goma arábiga y almidón de trigo (1.38, 0.28 y 0.74 g H₂O/ g de muestra) respectivamente (Soua *et al.*, 2020).

Tabla 2. Capacidad de retención de agua (CRA), actividad floculante (AF) y actividad antioxidante (AA) de las nano y micropartículas de ZnO-EPS. Table 2. Water holding capacity, flocculating activity and antioxidant activity, of ZnO-EPS nano and microparticles.

Tratamiento	CRA (g H ₂ O / g muestra)	AF (%)	AA (%)
EPS	1.74 ^d ± 0.01	30.38 ^d ± 1.06	23.93 ^d ± 1.13
NpZnO-EPS (1 mg/mL)	2.46 ^c ± 0.01	47.24 ^c ± 1.04	36.92 ^c ± 0.87
MpZnO-EPS (3 mg/mL)	2.96 ^b ± 0.02	61.89 ^b ± 0.32	46.93 ^b ± 1.73
MpZnO-EPS (6 mg/mL)	3.06 ^a ± 0.02	69.07 ^a ± 1.74	80.25 ^a ± 1.56

Letras diferentes por columna tienen diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Actividad floculante (AF) de las NpZnO-EPS

La AF incrementó de manera dependiente respecto a la concentración de EPS en la síntesis de las nanopartículas. La máxima AF fue 69.07 % para las MpZnO-EPS sintetizadas con 6.0 mg/L de EPS, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Tabla 2). Esto puede estar asociado a que las nanopartículas tienen una alta relación superficie-volumen y a la presencia de los EPS a escala micrométrica y nanométrica, los cuales pueden sufrir un reordenamiento molecular, con nuevas propiedades estructurales y mayor disposición de grupos funcionales activos (Dlamini *et al.*, 2019). Aunado a ello, la carga superficial puede afectar directamente el efecto de floculación (Li *et al.*, 2020). Los EPS libre tuvieron una actividad máxima del 30.38 %, coincidiendo con la actividad floculante reportada para los EPS de *Bacillus cereus* SK (31.22 %) (Busi *et al.*, 2016). El peso molecular del EPS ($M_w = 2.7$ MDa) puede también influir, ya que se ha reportado que los polisacáridos con alto peso molecular favorecen las interacciones intramoleculares entre los segmentos del polímero a través de enlaces de hidrógeno, y generan un impedimento estérico debido al gran volumen

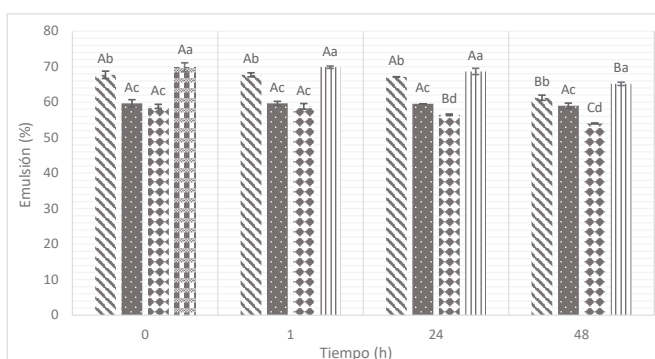
excluido de la molécula que conduce a la agregación disminuyendo las interacciones con los grupos funcionales del EPS en comparación con las nano y micro partículas de ZnO-EPS (Guo *et al.*, 2016).

Actividad antioxidante (AA) de las NpZnO-EPS

Las nano y micropartículas son altamente sensibles al pH, pudiendo generar dos fenómenos diferentes: la protonación/ionización de grupos funcionales y la degradación o escisión de enlaces lábiles (Yan y Ding, 2020). De esta manera, es posible que a pH 2 se promoviera una disociación parcial de los enlaces covalentes dativos de las NpZnO-EPS, con ello una liberación o mayor disposición de los electrones para la estabilización de radicales libres, como el DPPH (Hayat *et al.*, 2022). Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante (AA) mostraron un aumento en la capacidad de eliminación de radicales libres proporcional a la concentración de EPS empleados para la síntesis (Tabla 2). De acuerdo con los resultados se obtuvo el 80.25 % de actividad antioxidante con las MpZnO-EPS (6 mg/mL). Para el ácido ascórbico (antioxidante comercial) se ha reportado una actividad antioxidante de 90.59 y 94.40 % a 1 y 1.5 (mg/mL) respectivamente (Njus *et al.*, 2020) por lo que, estos resultados sugieren que las MpZnO-EPS (6 mg/mL) podrían funcionar como un antioxidante comercial competitivo.

Actividad y estabilidad emulsionante de las NpZnO-EPS

Los tratamientos con nano y micropartículas de ZnO-EPS mostraron estabilidad en la AE respecto al tiempo en presencia de aceites vegetales comerciales. Las emulsiones con los aceites de oliva y canola en presencia de las MpZnO-EPS sintetizadas con 6 mg/mL de EPS, presentaron los porcentajes de emulsión más altos (Figura 5). Además, las emulsiones se mantuvieron estables durante las 48 h evaluadas, manteniendo la emulsión por encima del 50 % en comparación con las emulsiones obtenidas con los EPS libres, las cuáles sufrieron un decremento en la estabilidad a partir de las 24 h obteniendo emulsiones por debajo del 50 % después 48 h (Figura 6), porcentaje mínimo requerido para considerarse un buen agente emulsificante (De Freitas *et al.*, 2016). La estabilidad de las emulsiones podría estar asociada al área de contacto entre las MpZnO-EPS y los componentes del aceite, ya que los EPS se encuentran más compactados dentro de la partícula formando una estructura similar a una red protectora alrededor de las gotas de aceite, con una rigidez elevada que reduce la tensión superficial. Además, reportes previos indican que los ácidos grasos insaturados tienen la capacidad de mejorar la carga superficial, además de formar una película rígida en las partículas confiriendo una mayor estabilidad en la emulsión, reduciendo de esta manera la aglomeración. Este efecto fue reportado en aceite de soja con un porcentaje elevado de ácidos grasos poliinsaturados (65 %), el cual formó una emulsión con un tamaño de gota estable en un 60 % del volumen total (Zheng *et al.*, 2021). De esta manera podrían explicarse los porcentajes de emulsión elevados en los aceites de oliva y canola, en cuya composición se encuentran principalmente ácidos grasos insaturados (86.5 y 91.4 % respectivamente).



Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencia estadística significativa de cada tratamiento respecto al tiempo ($p < 0.05$).

Figura 5. Actividad emulsificante de MpZnO-EPS (6 mg/mL) en presencia de aceites vegetales comerciales (canola®, Aurrera®, Oliva® y Nutrioli®).

Figure 5. Emulsifying activity of MpZnO-EPS (6 mg/mL) in the presence of commercial oils (canola®, Aurrera®, Oliva® y Nutrioli®).



Figura 6. Microfotografías (40x) de la emulsión de EPS libres (izquierda) y MpZnO-EPS (derecha) después de 48 h.

Figure 6. Microphotographs (40x) of free EPS emulsion (left) and MpZnO-EPS (right) after 48 h.

Actividad antimicrobiana de las NpZnO-EPS

La cepa de *S. aureus* mostró sensibilidad a las nano y micropartículas de ZnO-EPS a concentraciones de 1 y 1.5 mg/mL, mientras que el efecto inhibitorio sobre la cepa de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, se observó a partir de 0.5 mg/mL para todos los tratamientos. De acuerdo con los resultados reportados, el efecto bacteriostático sobre *S. aureus* podría asociarse con la composición de la pared celular, debido a que las bacterias Gram positivas, poseen una capa de peptidoglicano más gruesa con presencia de ácido teicoico y teicurónico unidos de manera covalente, confiriendo mayor resistencia a la célula (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014). La interacción de las MpZnO-EPS, es posible por procesos como la adhesión a la membrana del microorganismo, causado por fuerzas de Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas o interacciones con proteínas, ya que, las partículas de tamaño micrométrico no se internalizan, sino que forman agregados que permanecen adheridos irreversiblemente a la membrana celular, lo que causa inhibición en la capacidad para absorber nutrientes así como también, inhibición de las vías de síntesis de proteínas, lo que lleva a la pérdida de viabilidad (Wel *et al.*, 2017). Las nanopartículas por su parte inducen una respuesta antimicrobiana debido a la interferencia en los procesos

metabólicos y la alteración de los sistemas enzimáticos, que se asocia a mecanismos de adsorción, internalización y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lo que da como resultado la pérdida de la integridad celular y un aumento del estrés oxidativo que conduce al daño del ADN y muerte celular (Jin *et al.*, 2019).

Citotoxicidad de las NpZnO-EPS

Con relación a la citotoxicidad, la cuantificación de la hemoglobina glicosilada de las muestras tratadas con nano y micropartículas de ZnO-EPS no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con respecto a la muestra control sin adición de nano y micropartículas. Lo anterior indica que no existió efecto hemolítico, sugiriendo la posible biocompatibilidad de las partículas con células sanguíneas. Resultados similares fueron reportados para nanopartículas de ZnO evaluadas a una concentración de 0.1 mg/mL en el que se reportó una viabilidad de 97 % de glóbulos rojos, posterior a su tratamiento con nanopartículas (Khan *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Los EPS producidos por *Lpb. fabifermentans* tienen capacidad como agente reductor y estabilizador para la síntesis de nano y micropartículas ZnO-EPS, mejorando el índice de polidispersidad y controlando el tamaño de las mismas. Los EPS en forma de micropartículas presentaron una mejor actividad y estabilidad emulsionante, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, actividad floculantes y capacidad de retención de agua en comparación con los EPS de estructura macromolecular libre, sugiriendo hemocompatibilidad para poder ser empleadas en matrices alimentarias.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONAHCyT por la beca otorgada. Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el financiamiento otorgado al Proyecto No. 14388.22-P.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores no tienen ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Abinaya, M., Vaseeharan, B., Divya, M., Sharmili, A., Govindarajan, M., Alharbi, N. y Benelli, G. 2018. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high antibiofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and zika virus vectors. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 45: 93-103. doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.10.002.
- Adesulu-Dahunsi, A., Kumaraswamy, J. y Sanni, A. 2018. Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ Publishing*. 6: e5326. doi: 10.7717/peerj.5326.
- Alvarado, V. 2015. Evaluación del exopolisacárido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noreste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. [Tesis de maestría,

- Universidad Autónoma de Nuevo León]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/9408>. (Fecha de consulta: 10 de junio, 2022).
- Ates, O. 2015. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3: 200. doi: 10.3389/fbioe.2015.00200.
- Azim, A., Atta, A. y Khedr, M. 2018. Determination of intrinsic viscosity of polymeric compounds through a single specific viscosity measurement. *Polymer*. 39: 6827-6833. doi: 10.1016/S0032-3861(98)00184-0.
- Aziz, A., Shaniba, V. y Jayasree, P. 2020. Physico-chemical, photocatalytic and cytotoxicity evaluation of *Annona muricata* L. fruit extract derived zinc oxide nanoparticles in comparison to the commercial chemical versión. *Current Science*. 117: 1492-1504. doi: 10.18520/cs/v117/i9/1492-1504.
- Bajpai, V., Kamle, M. y Sukla, S. 2018. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26: 1201-1214. doi: [org/10.1016/j.jfda.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011).
- Busi, S., Karuganti, S. y Pattnaik, S. 2016. Sludge settling and algal flocculating activity of extracellular polymeric substance (EPS) derived from *Bacillus cereus* SK. *Water and Environment Journal*. 31: 97- 104. <https://doi.org/10.1111/wej.12215>.
- Chapot-Chartier, M. y Kulakauskas, S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13(1): S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- De Freitas, R. A., Nicolai, T., Chassenieux, C. y Benyahia, L. 2016. Stabilization of water-in-water emulsions by polysaccharide-coated protein particles. *Langmuir*. 32: 1227-1232. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03761>.
- Dlamini, N., Basson, A. y Pullabhotla, V. 2019. Optimization and application of bioflocculant passivated copper nanoparticles in the wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16: 2185. <https://doi.org/10.3390%2Fijerph16122185>.
- Estudillo-Díaz, E.B., Gutiérrez-Miceli, F.A., González-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., y Abud-Archila, M. 2022. Desarrollo y caracterización de películas activas con nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde. *Biocencia*. 25: 109-115. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v25i1.1683>.
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Ventura-Canseco, L. M. C., Gutiérrez-Miceli, F., Luján-Hidalgo, M. C., Abud-Archila, M. y Ruiz-Valdiviezo, V. 2020. Optimization of biomass production, lactic acid, and gastrointestinal simulation survival of *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG cultured in stirred tank bioreactor. *Agrociencia*. 54:147-162.
- Guo, M.Q., Hu, X., Wang, C., y Ai, L. 2017. Polysaccharides: Structure and Solubility. En Xu, Z. (Ed.) *Solubility of Polysaccharides* (pp. 7-22). INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69863>
- Hayat, S., Ashraf, S., Zubair, M., Aslam B. y Muzammil. 2022. Biofabrication of ZnO nanoparticles using *Acacia arabica* leaf extract and their antibiofilm and antioxidant potential against foodborne pathogens. *Plos One*. 17(1): e0259190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259190>.
- Ismail, B. y Nampoothiri, K. 2014. Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*. 51: 4012-4018. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0928-8>
- Jay-Chithra, M., Sathya, M. y Pushpanathan, K. 2015. Effect of pH on crystal size and photoluminescence property of ZnO nanoparticles prepared by chemical precipitation method. *Acta Metallurgica Sinica*, 28: 394-404. doi: 10.1007/s40195-015-0218-8.
- Jayachandran, A. y Nair, A. 2021. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Cayratia pedata* leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 26: 100995. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100995>.
- Jayawardena, B., Pandithavidana, D. y Sameera, W. 2017. Polysaccharides in solution: experimental and computational studies. En Xu, Z. (Ed.) *Solubility of Polysaccharides* (pp. 51-62). INTECH. doi: 10.5772/intechopen.69863.
- Jiang, G., Gan, L., Li, X. y Tian, Y. 2021. Characterization of structural and physicochemical properties of an exopolysaccharide produced by *Enterococcus* sp. F2 from fermented soya beans. *Frontiers in Microbiology*. 12:744007. doi: 10.3389/fmicb.2021.744007.
- Jin, J., Yang, Z., Xiong, W., Zhou, Y., Xu, R., Zhang, Y. y Zhou, C. 2019. Cu and Co nanoparticles co-doped MIL-101 as a novel adsorbent for efficient removal of tetracycline from aqueous solutions. *Science of the Total Environment*. 650: 408-418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.434>.
- Jo, D.H., Kim, J., Lee, T. y Kim, J. 2015. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine*. 11: 1603-1611. doi: 10.1016/j.nano.2015.04.015.
- Jurasková, D., Riveiro, S. y Silva, G. 2021. Exopolysaccharides produced by Lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*. 11:156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>.
- Kavitake, D., Balyan, S. y Devi, P. 2020. Evaluation of oil-in-water (O/W) emulsifying properties of galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676. *Journal of Food Science and Technology*. 57: 1579-1585. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04262-3>.
- Khan, S., Jabeen, F., Qureshi, A., Asghar, S. y Noureen, A. 2015. Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 6: 211-227. <https://www.researchgate.net/publication/280686023>.
- Leonia, M., Menezes, T., Souza, J. y Nágila, R. 2013. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary fibre*. 2: 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005>.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. y Tao, X. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*. 97: 7334-7343. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7912>.
- Li, H., Wu, S., Du, C. y Zhong, Y. 2020. Preparation, performances, and mechanisms of microbial flocculants for wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17:1360. doi: 10.3390/ijerph17041360.
- Lim, J., Yeap, S., Che, H. y Low, S. 2013. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*. 8: 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>
- Mahamuni, P., Patil, P. y Bohara, A. 2019. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 17: 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.11.007>.

- Murru, C. 2021. Potencial tecnológico de los puntos cuánticos de carbono antioxidantes: el impulso hacia metodologías verdes y nanotecnología sostenible. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo España. Disponible en: <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/61888>. (Fecha de consulta, 15 de mayo, 2022).
- Njus, D., Kelley, P.M., Tu, Y.J. y Schlegel, H.B. 2020. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 159: 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>.
- Ramírez-Pérez, J.I., Álvarez-Gutiérrez, P.E., Luján-Hidalgo, M.C., Ovando-Chacón, S.L., Soria-Guerra, R.E, Ruiz-Cabrera, Miguel Ángel, Lagunes-Grajales, A. y Abud-Archila, M. 2022. Effect of linear and branched fructans on growth and probiotic characteristics of seven *Lactobacillus* spp. isolated from an autochthonous beverage from Chiapas, Mexico. *Archives of Microbiology*. 204. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02984-w>
- Salunke, G., Gosh, S., Kumar, R., Khade, S. y Kale, T. 2014. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 2635-53. doi: 10.2147/IJN.S59834.
- Sathiyarayanan, G., Dineshkumar, K. y Yang, Y. 2017. Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*. 43:731-752. doi: 10.1080/1040841X.2017.1306689.
- Seedevi, P., Moovendhan, M., Vairamani, S. y Shanmugam, A. 2015. Structural characterization and biomedical properties of sulfated polysaccharide from the gladius of *Sepioteuthis lessoniana*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85: 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.066>.
- Silva, L., Neto, J., Cardarelli, H. 2019. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of microbiology*, 321-328. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Solorzano-Toalá, R., González-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., Gutiérrez-Miceli, F. y Camacho, O. 2020. Synthesis of silver nanoparticles from *Annona diversifolia* Safford and their potential use as a green alternative to control of pathogenic microorganisms. *Journal of Renewable Materials*. 8, 1129-1137. <https://doi.org/10.32604/jrm.2020.09845>.
- Soua L., Koubaa, M., Barba, F. y Fakhfakh, J. 2020. Water-soluble polysaccharides from *Ephedra alata* stems: structural characterization, functional properties, and antioxidant activity. *Molecules*. 25, 2210. <https://doi.org/10.3390/molecules25092210>.
- Suchomel, P., Kvitek, L., Puceck, R. y Vajda S. 2018. Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Scientific Reports*. 8: 4589. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22976-5>.
- Patil, S., Patil, C., Salunke, B. y Bathe, G. 2011. Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163: 463-72. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9054-5>.
- Trabelsi, M., Mamun, A., Sabantina L. y Ehrmann, A. 2019. Increased mechanical properties of carbon nanofiber mats for possible medical applications. *Fibers*. 7: 98. <https://doi.org/10.3390/fib7110098>.
- Wel, C., Heinrich, D. y Kraft, D. 2017. Microparticle assembly pathways on lipid membranes. *Biophysical Journal*. 113: 1037-1046. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.019>.
- Yan, Y. y Ding, H. 2020. pH-responsive nanoparticles for cancer immunotherapy: a brief review. *Nanomaterials*. 10: 1613. <https://doi.org/10.3390/nano10081613>.
- Yilmaz, T. y Simsek, O. 2020. Potential health benefits of rosy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Molecules*. 25: 3293. <https://doi.org/10.3390/molecules25143293>.
- Zhang, Q., Wang, J., Sun, Q., Zhang, S. y Tang, J. 2021. Characterization and antioxidant activity of released exopolysaccharide from potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* LM187. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31: 1144-1153. <https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03055>.
- Zheng, J., Sun, D., Li, X. y Liu, D. 2021. The effect of fatty acid chain length and saturation on the emulsification properties of pork myofibrillar proteins. *LWT*. 139: 110242. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110242>.
- Zisu, B. y Sha, N. 2003. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*. 86: 3405-3415. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73944-7.

Crecimiento, biomasa, rendimiento y componentes de canola (*Brassica napus* L.) en respuesta a la fuente nitrogenada

Growth, biomass, yield, and components of canola (*Brassica napus* L.) in response to nitrogen source

Claudia A. López-Arias¹, José Alberto Salvador Escalante Estrada¹, María T. Rodríguez-González¹, Cid Aguilar Carpio^{1*}

¹ Posgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km 36.5, municipio de Texcoco, estado de México, México, CP. 56230.

RESUMEN

La canola es un cultivo oleaginoso de gran importancia mundial. El nitrógeno es uno de los elementos que incrementan la producción del cultivo; por lo que es importante para los productores conocer los requerimientos nutrimentales de este cultivo y que tipo de fuente utilizar. El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento, biomasa y rendimiento de canola. La siembra de la canola cultivar "Canorte" fue bajo régimen de lluvia. Los tratamientos que se utilizaron fueron cuatro (testigo, fertilizante nitrogenado en forma de urea, fosfonitrato y sulfato de amonio). Para evaluar el crecimiento y rendimiento del cultivo se registró la altura de la planta, área foliar, biomasa total, índice de cosecha, rendimiento y sus componentes. El cultivo no presentó diferencias en la altura de la planta, biomasa total, índice de cosecha y rendimiento de grano entre las fuentes de nitrógeno utilizadas solo en comparación al testigo. El sulfato de amonio generó una mayor área foliar, número de racimos respecto a los demás fertilizantes, mientras que el número de silicuas también se incrementó por efecto del fosfonitrato. Las fuentes de nitrógeno promovieron un efecto positivo en el crecimiento de la planta y en el rendimiento de grano. El componente que mayor relación presentó con el rendimiento fue la biomasa total.

Palabras clave: Nitrógeno, nutrición, Brassicaceae, producción.

ABSTRACT

Canola is an oilseed crop of great worldwide importance. Nitrogen is one of the elements that increases crop production; therefore, it is important for producers to know the nutritional requirements of this crop and what type of source to use. The objective of the study was to determine the effect of the nitrogen source on the growth, biomass, and canola yield. The canola cultivar "Canorte" was sown during rainfall season. Four treatments were used (control, nitrogen fertilizer in the form of urea, phosphonitrates and ammonium sulfate). To evaluate growth and crop yield, plant height, leaf area, total biomass, harvest index, yield, and its components were recorded. The crop did not present differences in plant height, total biomass, harvest index and grain yield between the nitrogen sources used, in comparison to the control. Ammonium sulfate generated a greater leaf area and number of

bunches compared to the other fertilizers, while the siliques number also increased due the effect of phosphonitrates. Nitrogen sources promoted a positive effect on plant growth and grain yield. The components that presented the greatest relationship with yield was the total biomass.

Keywords: Nitrogen, nutrition, Brassicaceae, production

INTRODUCCIÓN

El género *Brassica* abarca cultivos de importancia económica para la agricultura, como son algunas hortalizas, además de semillas oleaginosas que se utilizan en alimentos, así como de biocombustibles (Bayer *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2018). La canola o colza (*Brassica napus* L.) es una planta que su semilla se aprovecha en la elaboración de aceite comestible en el mundo, ya que contiene de 36 a 40% de proteína y de 40 % de aceite que proviene del grano, siendo una especie para ser aprovechada, por sus propiedades nutricionales y organolépticas, así también se procesa como biodiesel y como fuente proteica para animales (harina). A nivel mundial Canadá, India, Alemania, Francia y China son los países líderes en la producción de canola (Al-Solaimani *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2018). Mientras que, en México se siembra una superficie de 3,202.48 ha de canola, con una producción de 1,968.34 t de grano; siendo, los principales estados productores Tamaulipas, Estado de México, Jalisco, Tlaxcala e Hidalgo (SIAP, 2019).

Para que la canola pueda mostrar todas sus capacidades alimenticias y nutraceuticas, es necesario que se le proporcione los insumos indispensables para lograr la máxima expresión de su potencial productivo. Uno de esos requerimientos es el nitrógeno (N), elemento más demandado por la planta, ya que actúa sobre procesos metabólicos que ayuda a promover la productividad en el cultivo (Ferreira y Ernst, 2014; Escalante-Estrada *et al.*, 2016; López *et al.*, 2019). Además de que el cultivo de la canola está directamente relacionado con la fertilización nitrogenada, con demandas que van desde los 40 hasta 70 kg ha⁻¹ de N (Borzaco *et al.*, 2019). De acuerdo con Escalante-Estrada *et al.* (2016), el rendimiento y productividad del cultivo de canola esta influenciado por varios factores, entre ellos la fertilización nitrogenada y distribución poblacional.

Las plantas absorben el nitrógeno por la raíz en sus formas iónicas más solubles como son el nitrato (NO₃⁻) y

*Autor para correspondencia: Cid Aguilar Carpio
Correo-e: aguilar.cid@colpos.mx.

Recibido: 23 de marzo de 2023

Aceptado: 19 de junio de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023

amonio (NH_4^+). Sin embargo, la respuesta de la planta a la nutrición nitrogenada varía según la especie en estudio fuente de nitrógeno y método de aplicación (Larios-González *et al.*, 2021).

Existen estudios en canola que se enfocan en los niveles de fertilización con nitrógeno, sin embargo, son muy pocos los estudios relacionados con el uso de diferentes fuentes de nitrógeno. Entre las fuentes más utilizadas son: la urea, sulfato de amonio y nitrato de amonio (Kaefer *et al.*, 2015; Chamorro *et al.*, 2017; López *et al.*, 2019). Por lo que, el objetivo del estudio fue determinar la acción de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento, producción de biomasa total y rendimiento de grano en el cultivo de canola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La investigación se realizó en el campo experimental del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' LN, 98° 53' LO, a 2 250 msnm), bajo régimen de lluvia. El clima es templado (Cw) (García, 2004), con suelo de textura arcillosa, pH 6.9, 2% de materia orgánica, conductividad eléctrica 0.47 dS m^{-1} , 9.5 mg kg^{-1} de nitratos, 11.6 mg kg^{-1} de amonio, 0.01 mg kg^{-1} de fósforo y 0.014 cmol kg^{-1} de potasio.

Tratamientos

La siembra de canola cultivar "Canorte 2010" se realizó de forma manual el 23 de mayo de 2017 en surcos distanciados a 80 cm, entre plantas a 10 cm con una densidad de población de 12.5 plantas m^{-2} . Antes de la siembra se realizó un riego para asegurar la germinación de la semilla. Los tratamientos que se utilizaron en el estudio se muestran en la Tabla 1, los cuales fueron suministrado en dos etapas, 50% antes de la siembra y la otra mitad en la primera escarda.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el estudio.

Tratamientos	Dosis (kg ha^{-1})
1. Testigo	Sin aplicación de nitrógeno
2. Urea (46 %, N)	100
3. Sulfato de amonio (SA, 20.5 % N y 24 % S)	100
4. Fosfonitrato (FN, 33 % N y 3 % P_2O_5)	100

Diseño experimental

El arreglo experimental fue en bloques completos aleatorios en cuatro replicaciones. La superficie de cada unidad experimental se conformó de cuatro surcos de 0.80 cm de ancho y 4 m de largo (12.8 m^2), el tamaño de la parcela experimental fue de 204.8 m^2 .

Variabes evaluadas

En el ciclo del cultivo se midió la temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$), temperatura mínima ($^{\circ}\text{C}$) y precipitación (mm), datos provenientes de la estación meteorológica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. Así mismo, se contabilizaron

los días de las etapas fenológicas del cultivo (Carrie, 2017): E: emergencia, CT: crecimiento longitudinal del tallo principal, AOF: aparición del órgano floral, FL: floración (50% de las flores en el tallo abiertas), FF: formación del fruto, MF: madurez fisiológica (cuando las vainas presentan color paja).

Durante el crecimiento del cultivo, se realizó un muestreo destructivo de tres plantas tomadas al azar dentro de la parcela útil, en etapa de floración 82 días después de la siembra (dds), dentro de la cual se midió el área foliar (cm^2) con el equipo electrónico LI-COR 3100 (EUA), por otro lado, se midió la altura de la planta (AP, cm) medida desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

A madurez fisiológica se realizó la cosecha del cultivo en donde se evaluó el rendimiento de grano (RG, g m^{-2}), el número de racimos (NR, m^2) y número de silicuas (NS, m^2), asimismo, se determinó la biomasa total (BT, g m^{-2}) con base en materia seca de las estructuras de la planta, para esto, las muestras se dejaron secar en una estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ hasta que se registró peso constante. Además, se calculó el índice de cosecha (IC, %), $\text{IC} = (\text{RG} / \text{BT}) \times 100$ (Escalante-Estrada *et al.*, 2016).

Análisis estadístico

Las variables medidas fueron procesadas mediante el paquete estadístico del SAS ver. 9.4, para posteriormente realizar el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$). Además, se realizó un análisis entre las variables de rendimiento y sus componentes con la prueba de correlación de Pearson ($\alpha = 0.05, 0.01$ y 0.001) (SAS, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenología y condiciones climáticas

Durante el desarrollo del cultivo las temperaturas máximas y mínimas oscilaron entre 24.8 y 11.9 $^{\circ}\text{C}$. Es importante señalar, que la temperatura máxima estuvo por debajo del límite mínimo permisible que mencionan Panozzo *et al.* (2014) y Escalante-Estrada *et al.* (2016). La precipitación acumulada fue de 475 mm y la evaporación de 493 mm. Cabe destacar que de S a FL la acumulación de la precipitación fue de 316 mm, mientras que de FL a MF fue de 158 mm.

Los días a ocurrencia de las etapas fenológicas en el cultivo no fueron modificados por las fuentes de nitrógeno aplicado, ya que, presentaron días similares entre cada evento (Tabla 2). La emergencia se presentó a los 7 dds, mientras que el CT a los 44 dds, para la AOF fue a los 63 dds, FL a 82 dds, FF a 93 dds y la MF a los 130 dds. La duración de las etapas fenológicas fue mayor a la reportada por Panozzo *et al.* (2014) y Escalante-Estrada *et al.* (2016), posiblemente debido a las diferentes condiciones ambientales, épocas de siembra y variedad de cultivo de canola utilizada.

El análisis de varianza mostró efectos significativos debido a las fuentes de nitrógeno utilizadas en la AP, AF, BT, RG, NR y NS, no así, para el IC (Tabla 3).

Altura de la planta (AP)

La AP fue favorecida por la aplicación de las diferentes fuentes de fertilización nitrogenada, las cuales no presentaron

Tabla 2. Promedios decenales de la temperatura (mínima y máxima) y acumulación decenal de la precipitación en el ciclo del cultivo de canola.**Table 2.** Decennial average of temperature (minimum and maximum) and decennial accumulation of precipitation in the canola crop cycle.

Mes	Decenal	Precipitación (mm)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Fases fenológicas
Mayo	3	59.6	24.8	16.2	S - E
	1	14.5	23.4	16.5	
Junio	2	22.5	24.8	12.8	
	3	18.1	23.4	13.8	
Julio	1	100.6	20.0	13.1	CT
	2	31.8	21.4	12.4	AOF
	3	24.7	22.2	12.1	
Agosto	1	29.1	22.8	13.3	FL
	2	15.9	23.5	13.2	
	3	71.7	21.4	13.5	
Septiembre	1	28.8	17.8	15.2	
	2	34.7	21.5	13.4	
	3	18.4	21.2	15.0	
Octubre	1	5.2	21.9	11.9	MF

S: siembra; E: emergencia; CT: crecimiento longitudinal del tallo principal; AOF: aparición del órgano floral; FL: floración; FF: formación del fruto; MF: madurez fisiológica.

S: sowing; E: emergency; CT: longitudinal growth of the main stem; AOF: appearance of the floral organ; FL: flowering; FF: fruit formation; MF: physiological maturity.

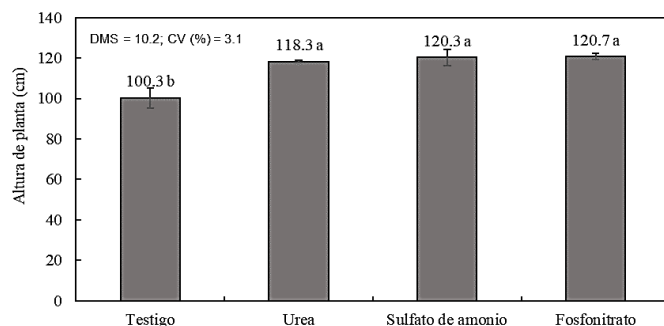
Tabla 3. Análisis de varianza para altura de la planta (AP), área foliar (AF), biomasa total (BT), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG) y sus componentes del cultivo de canola en función de la fuente nitrogenada.**Table 3.** Analysis of variance for plant height (AP), leaf area (AF), total biomass (BT), harvest index (IC), grain yield (RG) and its components of the canola crop as a function of the nitrogen source.

Fuente de variación	BT	IC	RG	NR	NS	AP	AF
Tratamiento	**	ns	**	**	**	**	**
Pr > F	0.0012	0.2394	0.0015	0.0001	< 0.0001	0.0028	< 0.0001
Media general	568	26	148	49	454	115	1912
CV (%)	12.1	6.7	11.4	6.5	2.1	3.1	6.5

NR = número de racimos; NS = número de silicuas.

NR = bunches number; NS = siliques number.

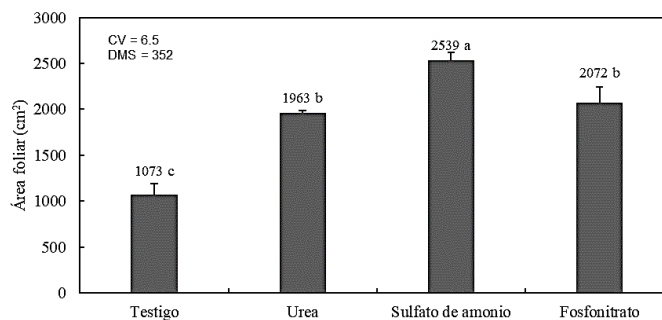
diferencias significativas entre fuentes, solo con respecto al testigo ($P > 0.05$). No obstante, la aplicación de FN generó un incremento del 20.3 %, seguido de SA y la urea, con un aumento del 19.9 y 17.9 % en relación con el testigo, respectivamente (Figura 1). Bybordi y Ebrahimian (2013) y

**Figura 1.** Altura de la planta en el cultivo de canola en función de la fuente nitrogenada (100 kg ha^{-1}).**Figure 1.** Plant height and root length in canola as a function of nitrogen source (100 kg ha^{-1}).

Al-Solaimanii *et al.* (2015) encontraron que al aumentar los niveles de nitrógeno (urea) también se acrecentaba la altura de la planta de canola. La disponibilidad de nitrógeno en el suelo independientemente de la fuente utilizada promovió el alargamiento celular de tallo (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Lo que también ha sido reportado por Kaefer *et al.* (2014) y Kaefer *et al.* (2015), quienes no observaron diferencias al aplicar SA y urea en la altura de la planta. Contrario a lo reportado por Öztürk (2010) al presentar una mejor respuesta con urea en comparación al SA.

Área foliar (AF)

El área foliar presentó un incremento con la aplicación de las fuentes nitrogenadas, en donde se registraron diferencias significativas respecto al testigo sin aplicar ($P > 0.05$) (Figura 2). Esto posiblemente se deba a la presencia de nitrógeno en el suelo, ya que es un nutrimento esencial en diferentes procesos metabólicos de la planta, debido a que, estimula el crecimiento del aparato fotosintético (Azcón-Bieto y Talón,

**Figura 2.** Área foliar por planta de canola en función de la fuente nitrogenada (100 kg ha^{-1}).**Figure 2.** Leaf area per canola plant as a function of nitrogen source (100 kg ha^{-1}).

2008). Estos resultados concuerdan con Bybordi y Ebrahimián (2013) quienes reportaron un aumento en el área foliar con el uso de diferentes niveles de urea, respecto al testigo sin aplicación, en el cultivo de canola. No obstante, se puede apreciar que, entre las fuentes de nitrógeno aplicadas, la máxima expansión foliar se logró con SA, seguido de FN, el cual no presentó diferencias con relación a la urea. Por lo que, es evidente que el sulfato de amonio fue más eficiente que la urea y el fosfonitrato en la formación y expansión de hojas; al ser, el sulfato de amonio un fertilizante ácido, disminuye el pH del suelo, proporcionando condiciones adecuadas para la asimilación del nitrógeno por la planta, además de que aporta una importante cantidad de azufre, siendo un elemento adecuado para cultivos como las brassicáceas (Salgado y Núñez, 2010; Öztürk, 2010). Por su parte Kaefer *et al.* (2014), registraron un incremento en la producción de área foliar en plantas de canola, con la aplicación ascendente de nitrógeno (20 a 120 kg ha⁻¹). Sin embargo, al evaluar dos fuentes de nitrógeno (Urea y SA) no observaron diferencias significativas, resultados contradictorios a los del presente estudio en donde el SA presentó una mayor AF en comparación a la urea.

Biomasa total, índice de cosecha, rendimiento y sus componentes

El comportamiento de la producción de biomasa total, rendimiento de grano y sus componentes fue diferente con aplicación de las fuentes de nitrógeno (Tabla 4). La biomasa total aumentó de manera significativa con la aplicación del SA, FN y urea respecto al testigo ($P > 0.05$). Por lo que se infiere, que el suministró de nitrógeno indistintamente de la fuente utilizada estimula la acumulación de biomasa en el dosel vegetal, ya que el N está relacionado en diferentes procesos metabólicos como la síntesis de proteína, aminoácidos y ácidos nucleicos (Kaefer *et al.*, 2014; Al-Solaimani *et al.*, 2015). En estudios realizados por Kaefer *et al.* (2015), Ma y Zheng (2016) y Chamorro *et al.* (2017), observaron un

aumento en la biomasa total al evaluar Urea (100 kg ha⁻¹ de N) y SA respecto a la nula fertilización. Por su parte López *et al.* (2019), quienes evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno sobre la biomasa total encontraron diferencias significativas, principalmente con el uso de SA. Contrario a lo observado en el presente estudio.

Con relación al IC, este no presentó diferencias significativas entre las fuentes de nitrógeno y el testigo ($P > 0.05$) (Tabla 4). Lo que implica, una acumulación de materia seca hacia el grano, en una proporción similar. Efectos semejantes fueron reportados por Ma y Zheng (2016) quienes no registraron diferencias en el IC con el nivel y fuente de nitrógeno en el cultivo de canola. Mientras que Escalante-Estrada *et al.* (2016), observaron que la aplicación de N en forma de urea generó una reducción en el IC.

Para al rendimiento de grano se puede observar que la aplicación de SA, FN y Urea lograron incrementar en un 118, 97 y 74% la producción en relación con el testigo, respectivamente (Tabla 4). Es importante mencionar, que entre las fuentes de nitrógeno estadísticamente no hubo diferencias en el RG solo respecto al testigo ($P > 0.05$). Lo que recalca la importancia del uso del N, por influir de manera evidente en el rendimiento del cultivo. Sobre lo anterior Larios-González *et al.* (2021), mencionan que el SA genera una menor volatilización respecto a la urea; la urea al pasar tiempo en el suelo se pierde una porción de N al ocurrir un proceso de volatilización de amoníaco (NH₃), por ende, se reduce su efecto nutrimental. Contrario a lo mencionado por diversos autores que han demostrado que la aplicación de N, generalmente en forma de urea con dosis ascendentes aumenta el rendimiento de grano (Kaefer *et al.*, 2015; Ma y Zheng, 2016; Escalante-Estrada *et al.*, 2016; Chamorro *et al.*, 2017).

El número de racimos y silicuas fue mayor con la aplicación del SA y FN, respectivamente, que cuando se aplicó urea, los cuales presentaron diferencias respecto al testigo ($P > 0.05$) (Tabla 4). Al respecto Ma y Zheng (2016), resaltaron la importancia de la aplicación de SA en canola con el incremento en algunos componentes morfológicos, asociados a la producción del cultivo. Por su lado Al-Solaimani *et al.* (2015), señalan que la aplicación de urea logra incrementar de manera significativa el número de silicuas, contrario a lo observado en el presente estudio.

Análisis de correlación entre la biomasa total, rendimiento de grano y sus componentes

El análisis de correlación (Tabla 5), indica que el RG tiene asociación con la BT ($r = 0.97$) y NS ($r = 0.89$) al igual que con el NR ($r = 0.85$). Esto indica que, para modificar la RG con las fuentes de nitrógeno, es indispensable en primer lugar incrementar el peso de la BT seguido del NS y NR, lo anterior se puede lograr con el SA, ya que generó una mayor BT y NR, así como también con el FN que promovió el mejor NS. Testimonios similares fueron observadas por Escalante-Estrada *et al.* (2016), los cuales encontraron que la BT, NS y número de granos son los componentes de mayor relación con el RG.

Tabla 4. Biomasa total, índice de cosecha, rendimiento de grano (RG) y componentes del cultivo de canola en función de la fuente nitrogenada.

Table 4. Total biomass, harvest index, grain yield (RG) and components of the canola crop depending on the nitrogen source.

Variables	Testigo	Urea (100 kg ha ⁻¹)	Sulfato de amonio (100 kg ha ⁻¹)	Fosfonitrato (100 kg ha ⁻¹)	Tukey (DMS)
Biomasa total (g m ⁻²)	312 b ^a	544 a	727 a	691 a	194.7
Índice de cosecha (%)	27 a	28 a	26 a	25 a	5.0
RG (g m ⁻²)	86 b	150 a	188 a	170 a	52.1
Número de racimos (m ²)	33 c	46 b	66 a	50 b	9.0
Número de silicuas (m ²)	343 c	428 b	510 a	535 a	27.9

^aValores con letra iguales en columnas indican diferencias no significativas de acuerdo con la prueba Tukey ($P < 0.05$)

^aValues with same letters in columns indicate differences are not significant according to Tukey's test ($P < 0.05$).

Tabla 5. Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson entre los componentes morfológicos, rendimiento de grano y producción de biomasa total en el cultivo de canola.

Table 5. Analysis of Pearson's correlation coefficients between morphological components, grain yield and total biomass production in canola crop.

	NR	NS	BT	RG
NR	1.00	0.78**	0.84**	0.85**
NS		1.00	0.93**	0.89**
BT			1.00	0.97**
RG				1.00

NR: número de racimos, NS: número de silicuas, BT: biomasa total, RG: rendimiento de grano; *, ** significativo ($P < 0.05$ y 0.01). NS: No significativo ($P > 0.05$).

NR: bunches number, NS: pods number, NGS: number of grains per pod, PG: individual grain weight, BT: total biomass, RG: grain yield; *, ** significant ($P < 0.05$ and 0.01). NS: non-significant ($P > 0.05$).

CONCLUSIONES

El cultivo de canola cultivar Canorte 2010 no presentó diferencias en la altura de la planta, biomasa total, índice de cosecha, rendimiento de grano con la aplicación de las diferentes fuentes de nitrógeno. El sulfato de amonio generó una mayor área foliar y número de racimos respecto a los demás fertilizantes, mientras, que el número de silicuas también se incrementó por efecto del fosfonitrato. En general, las fuentes de nitrógeno promovieron un efecto positivo en el crecimiento de la planta, así como en el rendimiento de grano en el cultivo de canola. El componente que mayor relación presentó con el rendimiento fue la biomasa total.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias a la aportación financiera del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Al-Solaimani, S., Alghabari, F. y Zahid, I.M. 2015. Effect of different rates of nitrogen fertilizer on growth, seed yield, yield components and quality of canola (*Brassica napus* L.) under arid environment of Saudi Arabia. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 6(4): 268-274.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill.
- Bybordi, A. y Ebrahimian, E. 2013. Growth, yield, and quality components of canola fertilized with urea and zeolite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 44(19): 2896-2915. <https://dx.doi.org/10.1080/00103624.2013.823986>
- Bayer, E.P., Hurgobin, B., Golicz, A.A., Kenneth, C.C.K., Yuan, Y., Tyng, L.H., Renton, M., Meng, J., Li, R., Long, Y., Zou, J., Bancroft, I., Chalhoub, B., King, J. G., Batley, J. y Edwards, D. 2017. Assembly and comparison of two closely related *Brassica napus* genomes. *Plant Biotechnology Journal*. 15(12): 1602-1610.

- Burzaco, J.P., Ciampitti, I.A. y García, O.F. 2019. Mejores prácticas de manejo para la nutrición del cultivo de Colza-Canola: Una revisión. *IPNI*. 13: 1-8.
- Carrie, K.A. 2017. Identifying Canola Growth Stages. *Plant and Soil Sciences*. 2: 1-8.
- Chamorro, A.M., Tamagno, L.N. y Sarandón, S.J. 2017. Mezcla de cultivares de colza canola (*Brassica napus* L.): una alternativa para aumentar la diversidad cultivada en sistemas extensivos de clima templado en transición agroecológica en Argentina. *Revista Brasileira de Agroecología*. 12(1): 010-018.
- Escalante-Estrada, J.A.S., Rodríguez-González, M.T. y Escalante-Estrada, Y.I. 2016. Rendimiento, eficiencia en uso del agua en canola en función del nitrógeno y distancia entre hileras. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(6): 1249. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.174>
- Ferreira, G. y Ernst, O. 2014. Diagnóstico del estado nutricional del cultivo de colza (*Brassica napus*) en base a curvas de dilución de nitrógeno y azufre. *Agrociencia Uruguay*. 18(1): 75-85. <https://doi.org/10.31285/AGRO.18.441>
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Ed. Serie libros.
- Gill, A.R., Zang, L., Ali, B., Farooq, A.M., Cui, P., Yang, S., Ali, S. y Zhou, W. 2015. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere*. 120: 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.029>
- Gómez, N.V., Miralles, D.J., Mantese, A.I., Menéndez, Y.C. y Rondanini, D.P. 2018. Colza: Un cultivo con historia en la FAUBA. *Agronomía y Ambiente*. 38(1): 23-26.
- Kaefer, J.E., Guimarães, V.F., Richart, A., Tomm, G.O. y Müller, A.L. 2014. Produtividade de grãos e componentes de produção da canola de acordo com fontes e doses de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 49(4): 273-280. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000400005>
- Kaefer, J.E., Richart, A., Nozaki, M.H., Daga, J., Campagnolo, R. y Follmann, P.E. 2015. Canola response to nitrogen sources and split application. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 19(11): 1042-1048. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n11p1042-1048>
- Larios-González, R.C., García, C.L., Jerónimo, R.M., Avalos, E.C. del S. y Castro, S.J.R. 2021. Pérdidas de nitrógeno por volatilización a partir de dos fuentes nitrogenadas y dos métodos de aplicación. *Siembra*. 8(2): e2475. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.2475>
- López, A.C.A., Escalante-Estrada, J.A.S., Rodríguez, G.M.T., Conde, M.V.F., y Quero, C.A.R. 2019. Análisis de crecimiento y rendimiento de canola en función de la fuente nitrogenada. *Academia Journals Morelia*. 11(2): 1523-1527.
- Ma, B.L. y Zheng, Z.M. 2016. Relationship between plant nitrogen and phosphorus accumulations in a canola crop as affected by nitrogen management under ample phosphorus supply conditions. *Canadian Journal of Plant Science*. 96(5): 853-866. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0374>
- Öztürk, Ö. 2010. Effects of source and rate of nitrogen fertilizer on yield, yield components and quality of winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 70(1): 132-141. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392010000100014>.
- Panozzo, L.E., Zuchi, J., Da Silva, F.D., Barros, P.L., Dos Santos, D.D.C.F., Silva, B.W. y Tomm, G.O. 2014. Evaluation of some

- hybrids of canola in function of sowing dates in Viçosa, MG, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*. 9(32): 2488-2494. <https://doi.org/10.5897/AJAR2014.8876>
- Quintana-Chimal, M.A., Estrada-Campuzano, G., Martínez-Rueda, C.G., y Domínguez-López, E.J.M.A. 2013. Variabilidad genotípica en atributos ecofisiológicos del rendimiento y calidad industrial de canola. *Terra Latinoamericana*. 31(1): 47-56.
- Salgado, G.S. y Núñez, E.R. 2010. Manejo de fertilizantes químicos y orgánicos. Mundi Prensa México, S. A. de C. V.
- SAS. 2013. Base SAS® 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures, Second Edition. Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc.), 1-8. [https://doi.org/10.1016/0370-2693\(82\)91293-X](https://doi.org/10.1016/0370-2693(82)91293-X)
- Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2019. Sistema de información agropecuaria de consulta. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.

Effectiveness of a school-based obesity prevention program on the BMI Z-score and body fat at 6 months in Mexican children: Pilot study of a cluster randomized controlled trial

Efectividad de un programa escolar de prevención de obesidad sobre el puntaje Z de IMC y grasa corporal a 6 meses en niños mexicanos: estudio piloto de un ensayo controlado aleatorio por conglomerados

Diana L. Ramírez-Rivera¹, Teresita Martínez-Contreras², Rosa C. Villegas-Valle², Gerardo Álvarez-Hernández³, Roberto González-Fimbres⁴, Omar Yaxmehen Bello-Chavolla⁵, Elisa Pineda⁶, Julián Esparza-Romero⁷, Michelle M. Haby², Rolando G. Díaz-Zavala^{1*}

¹ Doctorado en Ciencias Químico Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora. Luis Encinas y Rosales S/N, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000; a214207064@unison.mx

² Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Hermosillo, Sonora, Méx. C.P. 83000; a214207064@unison.mx, teresita.martinez@unison.mx, haby@unimelb.edu.au, consuelo.villegas@unison.mx, giovanni.diaz@unison.mx

³ Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Hermosillo, Sonora, Méx. C.P. 83000. gerardo.alvarez@unison.mx

⁴ Laboratorio de Evaluación del Desempeño Físico Humano. Licenciatura en Entrenamiento Deportivo. Universidad Estatal de Sonora (UES). Av. Ley Federal del Trabajo. Colonia Apolo. C. P. 83100, Hermosillo, Sonora, Méx. roberto.gonzalez@ues.mx

⁵ The George Institute for Global Health, School of Public Health, Imperial College London, Scale Space, White City campus, London W12 7RZ. e.pineda@imperial.ac.uk

⁶ Centre for Health Economics and Policy Innovation. Imperial College London. Exhibition Rd, South Kensington, London SW7 2BX, Reino Unido. e.pineda@imperial.ac.uk

⁷ Unidad de Investigación en Diabetes, Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, NO.46. Col. La Victoria, C.P.83304, Hermosillo, Sonora.

ABSTRACT

School-based obesity prevention programs show positive effects on obesity and lifestyle parameters. However, the most efficient way to implement them is unknown. In Mexico, available studies present methodological limitations. The aim of this study is to evaluate the feasibility and effectiveness of a school-based obesity prevention program 1) implemented by advanced undergraduate nutrition and physical activity students, and 2) the same program implemented by schoolteachers and advanced undergraduate physical activity students, each compared to a control group of Mexican children. This study is a cluster randomized controlled trial. Children from several schools in Hermosillo, Sonora, Mexico will be invited to participate. The schools will be randomly assigned to one option: 1) the Planet Nutrition Program (PNP) delivered by advanced undergraduate nutrition and physical activity students, 2) PNP by schoolteachers, or 3) a control group. The intervention will consist of nutritional education and physical activity sessions for children and nutrition information for parents. The BMI Z-score, body fat, and lifestyle parameters will be evaluated at baseline and at 6 months. If successful, we expect that the program turns out a model for obesity prevention in this age group, with a potential for dissemination in Mexican schools.

Keywords: Schools, Prevention, Childhood obesity, Lifestyle, Randomized controlled trial

*Corresponding author: Rolando G. Díaz-Zavala
e-mail: giovanni.diaz@unison.mx

Received: June 22th, 2023

Accepted: July 23th, 2023

Published: September 1st, 2023

RESUMEN

Los programas escolares de prevención de obesidad muestran efectos positivos sobre parámetros de obesidad y estilo de vida. Sin embargo, se desconoce cuál es la forma más efectiva de implementación y en México los estudios disponibles muestran limitaciones metodológicas. El objetivo del estudio es evaluar la factibilidad y efectividad de un programa escolar de prevención de obesidad 1) implementado por estudiantes avanzados de nutrición y actividad física y 2) implementado por maestros escolares y estudiantes avanzados de actividad física, ambos en comparación a un grupo control de niños mexicanos. El presente es un ensayo controlado aleatorio por conglomerados. Se invitará a participar a escolares de distintas primarias públicas de Hermosillo, Sonora. Las escuelas se asignarán aleatoriamente a: 1) Programa Planeta Nutrición (PPN) brindado por estudiantes avanzados, 2) PPN por maestros escolares y 3) grupo control. La intervención consistirá en sesiones de nutrición y actividad física para escolares e información de nutrición para padres. Se medirá el puntaje Z de IMC, grasa corporal y variables de estilo de vida al inicio y a los 6 meses. Se espera que el presente programa pueda ser un modelo de prevención de obesidad con un alto potencial de disseminación en las escuelas de México.

Palabras clave: Escuelas, Prevención, Obesidad infantil, Estilo de vida, Ensayo controlado aleatorio

INTRODUCTION

Childhood obesity is a global public health problem. About 158 million children and adolescents are affected by obesity worldwide (World Health Organization, 2018). This public health burden continues to increase, mainly in low- and middle-income countries (NCD Risk Factor Collaboration, 2017), such as Mexico, where 1.9 million school-age children and 3.3 million adolescents have obesity (Shamah-Levy *et al.*, 2020) and it is estimated that by 2030, Mexico will be the seventh country ranked with the highest childhood obesity burden all over the world for the total number of children with obesity (Obesity Evidence Hub, 2021).

One of the strategies to mitigate childhood obesity is the implementation of school-based obesity prevention programs (World Health Organization, 2012). Different studies have been conducted to evaluate the effect of obesity prevention programs. A systematic review estimated the effect of different interventions which included physical activity and/or nutrition components. They found that, in schoolchildren, this type of program significantly reduced BMI in the intervention group compared to control (-0.05 kg/m^2 , 95 % CI $-0.10, -0.01$), however, most of such studies were carried out in high-income countries (Brown *et al.*, 2019). In a systematic review that include 29 Mexican programs aimed at preventing obesity in children or adolescents, only 3 of them were found to included both a nutrition and physical activity component, and only 9 of 16 studies that evaluated BMI as an outcome showed a significant effect of the intervention. Additionally, most of the studies were rated as low methodological quality i.e. (non-randomized controlled trial, lack of blinding, no intention to treat analysis for the data, no reporting of conflict of interest and funding) (Aceves *et al.*, 2021). Such shortcomings suggest the need to pursue more robust scientific evidence.

Previously, our research group developed a school-based obesity prevention program called "Planet Nutrition". The feasibility and effect of the program were evaluated through two pilot randomized controlled trials with schoolchildren from Hermosillo, Sonora; in face-to-face and online formats (Ramírez-Rivera *et al.*, 2021b; Ramírez-Rivera *et al.*, 2021a). The face-to-face program lasted 9 weeks and identified favorable trends in BMI Z-score changes at 9 weeks (-0.11 , 95% CI, $-0.23, 0.01$) compared to a control group. Additionally, significant differences were observed in waist circumference, body fat, physical activity, and nutrition knowledge. The study also showed that after the summer holidays (23-week follow-up) both groups increased their BMI Z-score (Ramírez-Rivera *et al.*, 2021b). This is consistent with evidence which suggest that summer holidays periods result in weight gain in children (Díaz-Zavala *et al.*, 2017; Franckle *et al.*, 2014). The online version of the program that continued for 4 months during the COVID-19 pandemic did not show a significant effect or trend in BMI Z-score, but both fruit consumption and quality of life improved significantly compared to the control group.

The implementers of any health program are crucial to warrant success because they can impact the delivery and

effect of the programs (Fernandez *et al.*, 2019). For instance, it has been observed that nutrition education programs delivered by trained schoolteachers or external healthcare personnel show the greatest effect (Murimi *et al.*, 2018). The participation of advanced students in nutrition and physical activity in undergraduate programs could enhance such effect. In most of Mexican Universities, students must participate in a social service program targeting the community (Diario Oficial de la Federación, 1981). Therefore, in Mexico such students could offer obesity prevention programs at a low cost.

Although, there is evidence of the importance of the qualifications and training of implementers, to our knowledge, the effect of school-based obesity prevention programs delivered by different implementers has not been evaluated. Furthermore, in middle-income countries, including Mexico, there is a lack of studies of school-based obesity prevention programs with adequate methodological quality (Aceves *et al.*, 2021; Singhal *et al.*, 2021).

Thus, the aim of the study is to evaluate the feasibility and effectiveness of a school-based obesity prevention program in Mexican schoolchildren implemented by 1) advanced undergraduate nutrition and physical activity students or 2) schoolteachers and advanced undergraduate physical activity students. The study will be conducted in two phases, the first will be a 6-month pilot study and the second a definitive study of 6 months with a follow-up at 12 months. The present protocol is mainly focused on the methods for the pilot study (phase 1). The complete process for the definitive study (phase 2), will be based on the pilot study results.

OBJECTIVES

Primary objective

To evaluate indicators of feasibility (retention, adherence, fidelity and acceptability) of a school-based obesity prevention program implemented by advanced undergraduate nutrition and physical activity students, or implemented by schoolteachers and advanced undergraduate physical activity students at 6 months.

Secondary objectives

To evaluate the effect of a school-based obesity prevention program on health indicators i.e., body size (BMI Z-score), body fat, waist circumference, relative fat mass, physical activity, sedentary behaviors, food consumption, nutrition knowledge, and quality of life at 6 months, and the BMI Z-score and body fat after the summer holidays (at 8 months). The following comparisons will be made:

1. Intervention implemented by advanced undergraduate nutrition and physical activity students compared to a control group.
2. Intervention implemented by schoolteachers and advanced undergraduate physical activity students compared to a control group.
3. Intervention implemented by advanced undergraduate nutrition and physical activity students compared to schoolteachers and advanced physical activity students.

MATERIAL AND METHODS

Trial design

This study is a cluster randomized controlled trial of three parallel groups with a 1:1:1 allocation ratio. To develop this protocol, the SPIRIT 2013 guide was followed (Figure 1) (Chan *et al.*, 2013). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Nursing Department from the Universidad de Sonora (EPD-007-2022) and registered in Clinical Trials: NCT05461703.

Study setting

Schoolchildren (ages 9 to 11 y, boys and girls) from different public elementary schools in Hermosillo, Sonora, Mexico will be invited to participate in the pilot study. The schools will be selected by convenience by blinded authorities (not involved in study recruitment or intervention) from the Ministry of Education and Culture of Sonora [Secretaría de Educación y Cultura (SEC) del Estado de Sonora]. The inclusion and exclusion criteria of schools will be evaluated and those that meet

	STUDY PERIOD										
	Enrolment	Allocation	Post-allocation						6 months	8 months	
TIMEPOINT**	-t ₁	0	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₆	t ₈	
ENROLMENT											
Eligibility Screen	X										
Informed consent	X										
Allocation		X									
INTERVENTIONS											
"Planet Nutrition" program			←—————→								
Control group			X								
ASSESSMENTS											
BMI Z-score (weight and height)	X							X	X		
Waist circumference	X							X			
Body fat	X							X	X		
Relative fat mass	X							X			
Physical activity and sedentary behavior	X							X			
Food frequency consumption	X							X			
Quality of life	X							X			
Nutrition knowledge Feasibility (retention, adherence, acceptability, and Fidelity)								X			

Figure 1. Enrolment, interventions, and assessments of the study.
Figura 1. Reclutamiento, intervenciones y evaluaciones del estudio.

the inclusion criteria will be randomized to one of the three groups.

Eligibility criteria

To be eligible for this study an informed consent and assent form must be signed by the parents and children respectively, and anthropometric measurements and lifestyle questionnaires must be completed.

Schools

Inclusion criteria: school principals and 4th-grade teachers willing to participate, availability of space for physical activity classes, and 4th grade groups with a minimum of 20 students. *Exclusion criteria:* participating in a similar study.

Schoolchildren

Inclusion criteria: to be a 4th grade student (9 to 11 years). *Exclusion criteria:* A personal condition that prevents conducting physical activity or a condition that parents consider should exclude their child from participating. *Elimination criteria:* Withdrawal of consent or assent. Development of a medical condition that prevents continuation of study activities.

While only children with informed consent will participate in the baseline and follow-up measurements, all children in the class will participate in the intervention activities.

Implementers

Inclusion criteria: Receiving 80 % of the program training. Respond satisfactorily to a questionnaire that assesses their knowledge of the program.

Study Intervention Components

School-based obesity prevention program: The intervention will be the same in the two different intervention groups: a program implemented by nutrition and physical activity advanced undergraduate students and program implemented by schoolteachers, both based on the "Planet Nutrition" Program (PNP), which was previously designed. This program has manuals specially designed for children; it include different nutrition topics (Table 1) and applies some behavior change strategies. The components of the program are the following:

Nutrition education sessions: They will consist of 1 face-to-face group session of 1 h per week in the school classroom during the regular school class schedule. The PNP manual will be used to present the different topics, workshops, games, and dynamics to reinforce learning. The program will be focused on establishing health-related goals, such as increasing the consumption of fruits and vegetables, increasing physical activity time, decreasing hours spent in front of a screen, and reducing the consumption of sweetened beverages. The program will also include the use of self-monitoring and positive reinforcement.

Physical activity sessions: Three 1-hour classes per week will be implemented by physical activity undergraduate stu-

Table 1. Sessions and topics of the "Planet Nutrition" program
Tabla 1. Sesiones y temas del programa "Planeta Nutrición"

Sessions	Topics
1	Creating healthy habits
2	What is excess weight?
3	Is it really bad to eat ultra-processed food?
4	The bitter truth of sweetened beverages
5	The importance of physical activity
6	Sedentary behaviors
7	Food Guidelines: My plate
8	Analyzing my healthy lunch
9	Jar for healthy drinking
10	Sweetened beverages vs. healthy lunch
11	Reading food labels
12	Importance of healthy nutrition
13	Ultra-processed food
14	Sustainable lifestyle
15	Traditional Mexican diet
16	Healthy lunch
17	Identifying good and bad fats
18	What is important to know about sodium?
19	Smoking
20	Learning about Cancer
21	Importance of consuming fruits and vegetables
22	Vitamins and minerals
23	Why is fiber consumption important
24	Gut microbiota
25	Jeopardy: Let's put the learning into practice
26	How to prepare a salad
27	Preparing healthy desserts
28	How to be active during summer holidays
29	Healthy nutrition in summer holidays
30	Sleep and growth
31	Planet Nutrition Challenge

dents at the school during the regular school class schedule, independent of the school's curricular physical activity classes. A physical activity manual designed by the study team will be used.

Parents' participation: Parents will receive weekly nutrition and health information through WhatsApp or email, depending on parent's preference. The topics for which information is sent will be similar to what the children see in the nutrition sessions, and are designed to reinforce the children's learning. In addition, recommendations for healthy eating at home will be provided. The implementers (advanced nutrition students or schoolteachers) will send the information.

Control group: Schoolchildren will continue with their normal school nutrition and physical activity classes. At the

end of the study, they will have access to the program materials through a web page.

Implementers

PNP implemented by students: The program will be delivered by a team of advanced Nutrition undergraduate students of Universidad de Sonora, and advanced undergraduate students of the Sports Training degree from Universidad Estatal de Sonora. We define advanced students (or interns) as those who are studying the last 3 semesters of the degree or who offer a service but do not have their professional title yet.

PNP implemented by schoolteachers: The program will be delivered by the 4th grade teachers of the eligible schools and the same physical activity advanced undergraduate students of the student implemented group.

Both groups of implementers will receive previous training from a registered nutritionist and a physical activity teacher with experience in this program. The nutrition training will be delivered in 3 d of 1 h each, separately for each group of implementers. The nutrition advanced students will have the training at the university and the schoolteachers at the school (individually for each teacher) in their free time. The main purpose of the tutoring will be to provide the objectives and activities of the program, to explain the topics of nutrition and health and to review the schedule of the study.

The Physical activity students will have their training for 1 month in their University. In this training, they will plan the classes and to study general concepts.

Sample size

Fifteen public schools (350 to 400 students) from Hermosillo, Sonora, Mexico will be invited to participate in the pilot study. The sample size was determined based on the feasibility of providing the program, and finding possible positive effects on the variables of interest (BMI Z-score and body fat). The calculation of the sample size is not essential in a pilot study, its main objective is to explore the feasibility of the intervention to later perform the sample calculation for a future definitive trial (Eldridge *et al.*, 2016).

Recruitment

The nutrition team of the study will visit the schools to provide the information and the informed consent and assent forms. One 4th grade group of the participating schools will be randomly chosen. In general, public schools in Mexico have 3 groups of each grade; but for this phase, it is intended to work with one group per school due to the sample size.

Allocation of groups

The schools that meet the inclusion/exclusion criteria will be randomized to one of the three groups: 1) PNP implemented by advanced undergraduate students in nutrition and physical activity, 2) PNP by schoolteachers and advanced undergraduate students in physical activity, and 3) control group. A person independent of the recruitment and the intervention will perform the random allocation of the schools,

stratified by the census-tract level of socioeconomic status (SES) where the school is placed; the SES will be based on the social marginalization index (CONAPO, 2020), this at a single point in time – thus ensuring allocation concealment. The random number sequence will be generated using the software “Research Randomizer” <https://randomizer.org/> (Urbaniak and Plous *et al.*, 2013).

Data collection

Measurements will be made at baseline and at 6 months by a team of advanced nutrition students that are independent of recruitment and intervention, over a 4-week period at each time point in the schools. The BMI Z-score and body fat will also be measured after the summer holidays (8 months from baseline). The questionnaires on physical activity and sedentary behaviors, diet, and quality of life will be answered by parents through Google Forms online questionnaires. Children will answer the questionnaires on quality of life and nutrition knowledge at school under the supervision of the measurement team.

Primary outcome

Feasibility

Feasibility will be evaluated at the end of the study (6 months) and consists of the evaluation of participant retention, adherence, fidelity, and program acceptability:

Retention: number of schools and participants that complete the final measurements. A retention of participants and schools > 80 % at 6 months will be considered excellent, 50 – 80 % moderate and < 50 % low.

Adherence: An attendance list will be taken in the nutrition and physical activity classes. At the end of the study, the parents of children in intervention group will also be asked about the number of sent materials that they readthrough an online questionnaire. Attendance at program activities > 80 % at 6 months will be considered excellent, 50 - 80 % moderate and <50 % low attendance.

Fidelity: Fidelity will be evaluated through a monitoring list. The implementers must mark the session provided, date, and duration. There will be a monthly visit to the school by the nutritionist of the team to verify how the program is being provided in accordance with the established protocol. An adequate fidelity will be considered when ≥ 60 % of the program is provided, moderate from 40 - 60% and low <40 %.

Acceptability: a questionnaire will be applied to children, parents, and implementers to qualify the program and materials in a scale from 0 to 10. In addition, they will be interviewed about the perceived obtained benefits or barriers. Good acceptance will be considered from 10 - 8 points, moderate acceptance from 8 - 5 points, and poor acceptance ≤ 5 points.

Secondary outcomes

BMI Z-score: Calculated using the weight, height, sex, and date of birth of the children, using the “Anthro Plus” v.1.0.4 software, which uses the WHO reference tables (World Health Organization, 2007).

Body fat: Body composition will be obtained using electrical bioimpedance RJA Quantum II (Clinton Township, Michigan) following the methodology recommended by the manufacturer (RJA Systems, Inc. 2013). With the data obtained (resistance and reactance values in ohms), an equation designed to estimate fat-free mass in Mexican children will be used (Ramírez *et al.*, 2012). The fat mass will be obtained by difference; by subtracting the kilograms of fat-free mass from the total kilograms of the subject and its percentage will be calculated later.

Waist circumference: The measurement will be taken at the umbilical scar level, with the participant standing, using a metallic anthropometric tape (Lufkin Executive Thinline W606PMM). Participants will be asked to indicate their umbilical scar location and to inhale and exhale (Marfell *et al.*, 2006).

Relative fat mass: Estimated using a formula validated in American children aged 8 to 14 years. Data of waist circumference (cm), height (cm), and sex will be included in the formula to obtain the value (Woolcott *et al.*, 2019).

Food consumption: Some questions from the semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) from the National Health and Nutrition Survey (ENSANUT) will be used. We will ask about the frequency of consumption of ultra-processed foods (sweet beverages, fried foods, cakes, and cookies) and healthy foods (fruits, vegetables, and water) in the previous 7 days. For each food, the size of the portion consumed will be asked, considering an average portion established in the FFQ (Shamah-Levy *et al.*, 2020).

Physical activity and sedentary behavior: The questions on physical activity and a sedentary lifestyle will be used from "The Health Behavior in School-Age Children" (HBSC) questionnaire. The questionnaire includes the days and time (intensity, duration, and frequency) dedicated to physical activity in the last 7 days. In addition, the questionnaire includes a section of time dedicated to sedentary activities during the week and on the weekend (Currie *et al.*, 2014).

Quality of life: The PedsQL™ questionnaire (Pediatric Quality of Life Inventory) will be used. This generic health status instrument assesses the frequency of problems experienced in the past month in the following aspects: physical, emotional, social, and school functioning. Responses are on a 5-point Likert scale (never = 0 to always = 4). The score for each item is inverted and converted to a linear scale from 0 to 100, with a higher score indicating a better quality of life (Varni *et al.*, 2001).

Nutrition knowledge: A questionnaire designed by the study team will be used to assess knowledge on nutrition issues. It consists of 32 questions about nutrition and health. Knowledge will be evaluated on a scale from 0 to 10, with the more correct answers, the higher the score.

Statistical Analysis

The difference in baseline characteristics between groups will be analyzed using an ANOVA analysis for the quantitative variables with Fisher LSD tests for post-hoc analyses and a chi-square test for the categorical outcomes. If there

are significant differences between groups at baseline, an adjustment will be made in the follow-up analysis; otherwise, adjustment for additional relevant covariates will be considered based on previous works to account for the possibility of residual confounding. To evaluate the differences between groups in feasibility and the change of the BMI Z-score, body fat, and secondary variables at the beginning and at the end of the intervention, a mixed effects lineal model will be used to evaluate the effect between groups and within groups considering individual changes amongst subjects as a random intercept in the model. All analyses will be performed by intention-to-treat (ITT). If follow-up data is not obtained for any reason or subjects were excluded due to a protocol violation, only their baseline measurement will be considered within the model and a sensitivity analysis will be conducted to assess the impact of their removal into the model estimates. The R studio software will be used to perform the analysis (Allaire, 2011).

Data management

Data obtained through physical documents will be transferred to a digital database. Two people from the study team will be in charge of entering the data through double verification to avoid errors. Physical documents will be kept at Universidad de Sonora. Only the study team will have access to the physical and digital documents for study purposes. The database will not obtain identifiable data (complete names, telephone numbers, etc.), only codes will be used.

Data Monitoring

This study does not have an external monitoring committee. The progress of the work will be presented to the group of researchers participating in the study. Likewise, once the final evaluations of the program are completed, the results will be presented to the Research Ethics Committee of the Nursing Department of the Universidad de Sonora, the Ministry of Education and Culture of Sonora [Secretaría de Educación y Cultura (SEC) and to directors and schoolteachers. It is intended to publish the results of the study in a peer-reviewed journal.

Risks

None of the measurements or activities in the study have a negative effect on the participant's health, neither in the short nor in the long term. The physical activity sessions are designed for children, with a moderate intensity level, which minimizes any risk of injury.

DISCUSSION

Strengths

One of the advantages of the present study is the cluster randomized controlled trial design. This design minimizes the risk of contamination between the groups of the study by having different schools. Second, a pilot study will be conducted to test feasibility before conducting a larger study.

Finally, the study team has previous experience in the Planet Nutrition program.

Limitations

Due to the nature of the study, the intervention will not be blinded. Moreover, the lifestyle variables will be self-reported and not evaluated through objective measurements, which increases the risk of bias.

CONCLUSION

If successful, we expect that the program could be a model for obesity prevention with a high potential for dissemination in Mexican schools.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Nutrition Health Promotion Center from Universidad de Sonora for the financial support for the pilot study. Also, we thank the Ministry of Education and Culture of Sonora for giving permission and facilitating access to the schools.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report having no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Aceves-Martins, M., López-Cruz, L., García-Botello, M., Gutiérrez-Gómez, Y.Y. and Moreno-García, C.F. 2021. Interventions to Prevent Obesity in Mexican Children and Adolescents: Systematic Review. *Prevention Science*. 563-586. doi:10.1007/s11121-021-01316-6.
- Allaire J. 2011. R Studio.
- Brown, T., Moore, T., Hooper, L., Gao, Y., Zayegh, A., Elwenspoek, M., Foxen, S.C., Magee, L., O'Malley, C., Waters, E. and Summerbell, C.D. 2019. Interventions for preventing obesity in children (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD001871.pub4.www.cochranelibrary.com.
- Chan, A.W., Tetzlaff, J.M., Gøtzsche, P.C., Altman, D.G., Mann, H., Berlin, J.A., Dickersin, K., Hróbartsson, A., Schulz, K.F., Parulekar, W.R., Krleža-Jeric, K., Laupacis, A. and Moher, D. 2013. SPIRIT 2013 explanation and elaboration: guidance for protocols of clinical trials. *BMJ (Clinical research ed.)*. 346, 1-42. doi:10.1136/bmj.e7586.
- Consejo Nacional de Población (CONAPO), 2020. Índices de Marginación 2020. Gobierno de México. [Consultado 28 Febrero 2023]. Disponible <https://www.gob.mx/conapo/documentos/indices-de-marginacion-2020-284372>
- Currie, C., Inchley, J., Molcho, M., Lenzi, M., Veselska, Z. and Wild, F. 2014. Health Behaviour in School-aged Children (HBSC) study protocol: background, methodology and mandatory items for the 2013/14 survey. <http://www.hbsc.org>.
- Diario Oficial de la Federación (30/03/1981). Reglamento para la prestación del servicio social de los estudiantes de las instituciones de educación superior en la República Mexicana. Recuperado de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4634627&fecha=30/03/1981
- Díaz-Zavala, R.G., Castro-Cantú, M.F., Valencia, M.E., Álvarez-Hernández, G., Haby, M.M. and Esparza-Romero, J. 2017. Effect of the holiday season on weight gain: A narrative review. *Journal of Obesity*. 2017. doi:10.1155/2017/2085136.
- Eldridge, S.M., Lancaster, G.A., Campbell, M.J., Thabane, L., Hopewell, S., Coleman, C.L. and Bond, C.M. 2016. Defining feasibility and pilot studies in preparation for randomized controlled trials: Development of a conceptual framework. *PLoS ONE*. 11 (3), 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0150205.
- Fernandez, M.E., Ruiter, R.A.C., Markham, C.M. and Kok, G. 2019. Intervention mapping: Theory and evidence-based health promotion program planning: Perspective and examples. *Frontiers in Public Health*. 7 (AUG). doi:10.3389/fpubh.2019.00209.
- Franckle, R., Adler, R. and Davison, K. 2014. Accelerated Weight Gain Among Children During Summer Versus School Year and Related Racial / Ethnic Disparities: A Systematic Review Data sources. *Preventing Chronic Disease*. 11 (12), 1-10.
- Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A. and Carter, L. 2006. International Standards for Anthropometric Assessment. ISAK, Editor. Potchefstroom, South Africa.
- Murimi, M.W., Moyeda-Carabaza, A.F., Nguyen, B., Saha, S., Amin, R. and Njike, V. 2018. Factors that contribute to effective nutrition education interventions in children: A systematic review. *Nutrition Reviews*. 76 (8), 553-580. doi:10.1093/nutrit/nuy020.
- NCD Risk Factor Collaboration. 2017. Articles Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016 : a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128 9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 390, 2627-2642. doi:10.1016/S0140-6736(17)32129-3.
- Obesity Evidence Hub. 2021. Obesity trends in children globally. 2021. <https://www.obesityevidencehub.org.au/collections/trends/children-global-context> [Accessed: 20 November 2021].
- El País. 2021. Universidades que imparten Deportes. <https://elpais.com/especiales/2015/carreras-mexico/carrera/universidad/deportes.html>.
- Ramírez-Rivera, D.L., Martínez-Contreras, T., Henry-Mejía, G., Ruelas, A.L., *et al.* 2021a. Efecto de una intervención en línea de cambio en el estilo de vida sobre el puntaje zIMC de escolares mexicanos: protocolo de ensayo controlado aleatorizado piloto cegado a evaluadores durante la pandemia por COVID-19. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 25 (2). doi:10.14306/renhyd.25.S2.1320
- Ramírez-Rivera, D.L., Villegas-Valle, R.C., Martínez-Contreras, T., *et al.* 2021b. Preliminary results of the planet nutrition program on obesity parameters in Mexican schoolchildren: Pilot single-school randomized controlled trial. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18 (2), 1-15. doi:10.3390/ijerph18020790
- Ramírez, E., Valencia, M.E., Bourges, H., Espinosa, T., Moya-Camarena, S.Y., Salazar, G. and Aleman, H. 2012. Body composition prediction equations based on deuterium oxide dilution method in Mexican children: a national study. *European Journal of Clinical Nutrition*. (February), 1099-1103. doi:10.1038/ejcn.2012.89.

- RJL Systems Inc. 2013. 33939 Harper Ave, Clinton Township, MI 48035. <https://www.rjlsystems.com/products/quantum-ii/#section=description>
- Schaap, R., Bessems, K., Otten, R., Kremers, S. and van Nassau, F. 2018. Measuring implementation fidelity of school-based obesity prevention programmes: A systematic review. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 15 (1), 1-14. doi:10.1186/s12966-018-0709-x.
- Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Rivera-Dommarco, J. and Hernández-Ávila, M. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016). gob.mx/salud/documentos/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-de-medio-camino-2016.
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J.A. and Rivera-Dommarco, J.Á. 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19 Resultados nacionales. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf.
- Singhal, J., Herd, C., Adab, P. and Pallan, M. 2021. Effectiveness of school-based interventions to prevent obesity among children aged 4 to 12 years old in middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 22 (1), 1-39. doi:10.1111/obr.13105.
- Universidad de Guadalajara. 2021. Pedirá AMFEN regular apertura de escuelas de Nutrición en México. 2021. <http://www.cualtos.udg.mx/noticia/pedira-amfen-regular-apertura-de-escuelas-de-nutricion-en-mexico>.
- Urbaniak, G.C. and Plous, S. 2013. Research Randomizer (Version 4.0). <http://www.randomizer.org/>
- Varni, J.W., Seid, M. and Kurtin, P.S. 2001. PedsQLTM 4.0: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory™ Version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations. *Medical Care*. 39 (8), 800-812. doi:10.1097/00005650-200108000-00006.
- World Health Organization. 2012. Population-based approaches to childhood obesity prevention. https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/WHO_new_childhoodobesity_PREVENTION_27nov_HR_PRINT_OK.pdf.
- Woolcott, O.O. and Bergman, R.N. 2019. Relative fat mass as an estimator of whole-body fat percentage among children and adolescents: a cross-sectional study using NHANES. *Scientific Reports*. 9 (1), 1-14. doi:10.1038/s41598-019-51701-z.
- World Health Organization (WHO). 2007. Growth reference 5-19 years. <https://www.who.int/growthref/en/> [Accessed: 1 October 2019].
- World Health Organization (WHO). 2018. Obesity and Overweight. 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Accessed: 10 October 2019].

Calidad física y rendimiento del grano de frijol azufrado en el norte de Sinaloa

Physical quality and grain yield of Azufrado beans in northern Sinaloa

Carlos Patricio Saucedo-Acosta¹, Franklin G. Rodríguez-Cota², María Adilene Cota-Sandoval¹, Jorge Luis Flores-Sánchez³, Raúl H. Saucedo-Acosta^{2*}

¹ Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Calle 16 Av. Japaraqui S/N, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa. C.P. 81110.

² Campo Experimental Valle del Fuerte - INIFAP. Km 1609, Carretera Internacional México-Nogales, Juan José Ríos, Guasave, Sinaloa, C.P. 81110.

³ Yara México. Av. Américas 1545, Guadalajara, Jalisco, México, C.P. 44630.

RESUMEN

El rendimiento y la calidad física del grano de frijol influyen en la rentabilidad y comercialización, su cuantificación permite identificar genotipos sobresalientes. El objetivo del estudio fue evaluar dichos aspectos en las variedades Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste y en las líneas avanzadas: Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11 y Mo 19-20-ERR2-12. El diseño experimental fue bloques al azar con cuatro repeticiones. El rendimiento ($t\ ha^{-1}$), peso de 100 granos (PCG, g) y brillo (%) se obtuvieron de grano seco y limpio. En cada grano, mediante análisis de imágenes digitales, se midió: tamaño (mm^2), largo, ancho, perímetro (mm), circularidad, color, brillo y luminosidad. El rendimiento fue desde 2.14 hasta 2.45 $t\ ha^{-1}$ ($p \geq 0.05$). El tamaño del grano mostró correlación ($p \leq 0.05$) con el PCG ($r = 0.97$) y con sus dimensiones ($r \geq 0.94$). El grano de las líneas avanzadas presentó mayor luminosidad ($DSH = 0.74$, $p \leq 0.05$). El grano grande y con menos oscurecimiento evidenció mayor calidad física en Mo 19-20-ERR2-9 y Mo 19-20-ERR2-11 ($p \leq 0.05$). El brillo y la luminosidad permiten identificar el oscurecimiento de la testa. El grano de Azufrado Noroeste y Azufrado Higuera tiene oxidación lenta y resistencia en Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11 y Mo 19-20-ERR2-12.

Palabras clave: Tamaño, color, brillo, luminosidad, testa

ABSTRACT

The yield and physical quality of common bean grains influence profitability and marketing. Its quantification allows the identification of genotype highlights. The aim of the study was to evaluate these aspects in Azufrado Higuera and Azufrado Noroeste varieties and Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11, and Mo 19-20-ERR2-12 advanced lines. The experimental design was a randomized complete block with four replications. The yield ($t\ ha^{-1}$), 100-grain weight (HGW, g), and initial grain brightness (%) were measured on dry and clean samples. For each grain, digital image analysis was used to measure size (mm^2), length, width, perimeter (mm), circularity, color, brightness, and luminosity. The yield was from 2.14 to 2.45 $t\ ha^{-1}$ ($p \geq 0.05$). Grain size correlated ($p \leq 0.05$) with HGW ($r = 0.97$) and with its dimensions ($r \geq 0.94$).

Grain luminosity was higher in advanced lines ($DSH = 0.74$, $p \leq 0.05$). Larger grains with less darkening evidenced better physical quality in Mo 19-20-ERR2-9 and Mo 19-20-ERR2-11 ($p \leq 0.05$). Brightness and luminosity allow the identification coat darkening. Oxidation is slow in Azufrado Noroeste and Azufrado Higuera varieties, whereas Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11, and Mo 19-20-ERR2-12 lines have resistance.

Keywords: Size, color, brightness, luminosity, coat

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie dentro de este género que, por su importancia económica y social, presenta mayor trabajo de mejoramiento genético (Anaya *et al.*, 2021). El fitomejoramiento de esta leguminosa se enfoca en obtener variedades con tolerancia a la sequía, plagas y enfermedades, así como incrementar el rendimiento y la calidad comercial del grano (Ayala *et al.*, 2021). Lo anterior implica identificar y seleccionar genotipos con características sobresalientes, para ello se evalúa la interacción del genotipo con el ambiente y las variables consideradas con respecto al grano son el rendimiento y sus propiedades físicas. La primera, por su relación con la rentabilidad, y la segunda, por asociarse con la preferencia del consumidor y con el precio del producto.

Los atributos físicos del grano con mayor atención del consumidor son el tamaño, la forma, el color y brillo de la testa (Rosales *et al.*, 2014), con base en éstos se establece el valor comercial del grano, por lo tanto, son evaluados por acopiadores y comercializadores (Ziegler *et al.*, 2021). Las características mencionadas, además de la longitud y anchura del grano, son necesarias para la descripción de las nuevas variedades de frijol (UPOV, 2015; SNICS, 2017). El oscurecimiento de la testa del grano está relacionado con su calidad, por lo que se considera en la descripción de las variedades (Acosta *et al.*, 2016; Spitti *et al.*, 2019; Rosales y Flores, 2022).

La forma, el color, la intensidad del color y el brillo del grano se obtienen de manera cualitativa mediante inspección visual (UPOV, 2015; SNICS, 2017), la estimación de esta manera es fácil y rápida, pero propensa a la subjetividad, con difícil repetitividad. La inferencia del tamaño mediante

*Autor para correspondencia: Raúl H. Saucedo Acosta

Correo electrónico: saucedo_raul@hotmail.com

Recibido: 12 de febrero de 2023

Aceptado: 28 de julio de 2023

Publicado: 29 de septiembre de 2023

el peso de 100 granos es práctica, aunque limita conocer la variabilidad dentro de la muestra; mientras que, las dimensiones lineales se obtienen de manera tradicional e implica medición manual por cada grano con el uso de vernier digital (Buzera *et al.*, 2018; Kläsener *et al.*, 2022; Wallander-Compean *et al.*, 2022), aun así, dicha tarea es lenta y tediosa (Hu y Zhang, 2021). La oxidación u oscurecimiento de la testa se estima en forma visual (Rosales y Flores, 2022), también se mide mediante colorímetros (Bento *et al.*, 2020), pero solo a nivel de muestra.

El rendimiento y la calidad física del grano de frijol son útiles como criterio de selección y en la caracterización de variedades; sin embargo, la evaluación objetiva de las características del grano es limitada debido a la carencia de equipos adecuados para su medición y a la baja eficiencia de los métodos manuales, lo que obliga a reducir el tamaño y número de muestras, con el riesgo de prescindir de la variación completa en las variables (Hu y Zhang, 2021). La opción cuantitativa sugerida por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) es el análisis de imágenes digitales (AID).

La UPOV recomienda realizar la descripción de variedades y las pruebas de distinción, homogeneidad y la estabilidad (DHE) mediante el AID, para reemplazar el fenotipaje cualitativo o visual (UPOV, 2013). El rendimiento y la calidad física del grano de frijol influyen en la rentabilidad y comercialización, su evaluación es necesaria para identificar genotipos sobresalientes, pero se requiere la medición cuantitativa de los atributos del grano para lograr mayor objetividad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento del grano de variedades y líneas avanzadas de frijol tipo azufrado y su calidad física mediante análisis de imágenes digitales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Campo Experimental Valle del Fuerte, Juan José Ríos, Guasave, Sinaloa, durante los ciclos otoño-invierno, 2018/2019, 2019/2020, 2021/2022. El suelo en el área experimental es arcillo arenoso, profundo, sin problemas de salinidad. Los genotipos utilizados fueron las variedades Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste y tres líneas avanzadas de frijol (Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11 y Mo 19-20-ERR2-12), seleccionados de manera previa por su resistencia al oscurecimiento u oxidación de la testa, alto rendimiento y peso del grano. Estos genotipos obtenidos o liberados en el programa de mejoramiento genético de frijol llevado a cabo por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

La siembra se realizó en húmedo, después del riego de presiembra, con densidad poblacional de 20 plantas m⁻², la fecha de siembra para el primer ciclo de cultivo fue el 21 de noviembre de 2018, en el segundo el 31 de octubre de 2019 y el tercero el 08 de diciembre de 2021 (Tabla 1). La fertilización se aplicó durante la presiembra con 103 kg ha⁻¹ de nitrógeno y 52 kg ha⁻¹ de fósforo; se suministraron tres riegos de auxilio, el combate de mosca blanca fue mediante Imidacloprid a dosis de 0.25 L ha⁻¹ y sin realizar el combate de enfermedades. El diseño experimental fue en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental constó de cuatro surcos de seis metros de longitud y separación entre camas de 0.8 m, mientras que la parcela útil se conformó por cinco metros de los dos surcos centrales (8.0 m²).

La cosecha del grano se realizó de forma manual, el peso de la muestra se obtuvo después de la criba y limpieza del grano para la estimación del rendimiento (t ha⁻¹). El almacenamiento de las muestras se realizó en costales de polipropileno transparente, en una bodega con luz natural y temperatura regulada en 18.0 °C. El peso de 100 granos (g) se obtuvo por su relación con las dimensiones del grano. El análisis de imágenes digitales (AID) se utilizó para medir características físicas del grano entero en cuatro muestras de 50 g de grano limpio, obtenidas al azar de la cosecha del ciclo O-I, 2019/2020. El oscurecimiento u oxidación de la testa se evaluó a través de la luminosidad y el brillo (%) medidos en grano recién cosechado y después de 23 meses de almacenamiento.

La digitalización de las muestras de grano fue con escáner de escritorio (Epson Stylus® modelo CX3900), la imagen se obtuvo a color con fondo negro, la resolución fue de 300 pixeles por pulgada (ppp) y se guardó en formato jpg. El AID se realizó con el programa ImageJ 1.53m, con éste se midió de manera automatizada el área (mm²), largo, ancho (mm), perímetro, circularidad (0 = polígono alargado, 1 = círculo) y color de cada grano. El color se obtuvo en el espacio de color RGB (por sus siglas en inglés, Red = rojo; Green = verde; Blue = azul) y en el CIELab (L = luminosidad, 0 = negro a 100 = blanco; a = coordenadas rojo+/verde-; b = coordenadas amarillo+/azul-).

El brillo de la testa (%) se calculó con base en la intensidad del RGB, ésta se normalizó entre valores de 0 y 1 al dividirla por 255, que es el valor máximo de cada píxel. La intensidad del RGB se utilizó por implementar factores de ponderación basados en la percepción humana: 0.299 para el canal rojo, 0.587 para el canal verde y 0.114 para el canal azul (Ferreira y Rasband, 2012). Por lo tanto, la fórmula propuesta para la obtención del brillo de la testa (%) = 100 x (rojo x 0.299 +

Tabla 1. Variables climáticas registradas en tres ciclos agrícolas del cultivo de frijol, Juan José Ríos, Sinaloa, México.
Table 1. Climatic variables recorded in three crop-growing cycles of bean, Juan José Ríos, Sinaloa, México.

Ciclo Otoño-Invierno	Fecha de siembra	Temperatura (°C)			Humedad Relativa (%)	Evapotranspiración (mm día ⁻¹)
		Mínima	Máxima	Media		
2018-2019	21/11/2018	10.75	26.95	17.99	74.63	3.16
2019-2020	31/10/2019	10.59	27.56	18.05	71.91	3.22
2021-2022	08/12/2021	9.05	27.80	17.49	75.64	3.95

verde x 0.587 + azul x 0.114) / 255. La luminosidad de la testa se obtuvo de manera directa del espacio de color CIELab.

El análisis de los datos fue con el programa R (R Core Team, 2021), se constató la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y para comprobar la homogeneidad de varianzas la prueba de Levene. El ANDEVA se realizó para el rendimiento promedio de los tres ciclos de producción, tamaño, peso, largo, ancho, perímetro, circularidad y color del grano. La comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey se implementó solo cuando las variables mostraron diferencia entre los genotipos ($p \leq 0.05$). La correlación de Pearson (r) se efectuó entre las dimensiones del grano. La prueba de t para muestras independientes se utilizó para comparar las variedades con las líneas, asimismo para contrastar entre el brillo y la luminosidad antes y después del almacenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mayor rendimiento de grano lo mostró la línea Mo 19-20-ERR2-12 con 2.45 t ha⁻¹ y el más bajo las variedades Azufrado Higuera y Noroeste con 2.14 t ha⁻¹, aunque sin diferencia significativa entre genotipos. El rendimiento promedio más alto se obtuvo en el ciclo 2019/2020, con 3.57 t ha⁻¹, lo cual se asocia con la fecha de siembra por estar dentro del periodo óptimo para las variedades mejoradas de frijol de tipo Azufrado, cultivadas en condición de riego en el estado de Sinaloa (Salinas *et al.*, 2012). La fecha de siembra tardía del 8 de diciembre en el ciclo de cultivo O-I, 2021/2022 tuvo el menor rendimiento con 1.29 t ha⁻¹ y fue diferente (DSH = 0.29, $p \leq 0.05$) a la siembra del 21 de noviembre realizada en el ciclo O-I, 2018/2019 que rindió 1.91 t ha⁻¹.

La línea Mo 19-20-ERR2-9 tuvo grano de mayor tamaño, longitud y perímetro, asimismo superó ($p \leq 0.05$) al resto de genotipos en el peso de 100 granos (Tabla 2). El tamaño presentó estrecha correlación ($p \leq 0.05$) con el peso de 100 granos ($r = 0.97$), el largo ($r = 0.99$), el ancho ($r = 0.94$), el perímetro ($r = 0.99$) y una relación negativa con la circularidad ($r = -0.84$); es decir, a menor tamaño la circularidad del grano es mayor. El peso de 100 granos mostró una correlación de 0.95 con el largo del grano y de 0.91 con el ancho ($p \leq 0.05$),

correlaciones mayores que las reportadas por Delfini *et al.* (2017) entre el peso de mil granos y el ancho ($r = 0.53$) y con el largo del grano ($r = 0.88$). Esta menor asociación puede estar relacionada con la variabilidad en el grosor o altura del grano. Sin embargo, si se descarta esta situación, otra posible causa podría ser la falta de representatividad de la muestra debido a la obtención de las dimensiones en una cantidad reducida de granos, riesgo advertido por Hu y Zhang (2021) y que es un aspecto importante a considerar al definir el tamaño de muestra, pues aún con el uso de vernier, suelen medirse solo 10 granos (Buzera *et al.*, 2018; Kläsener *et al.*, 2022).

La asociación entre el rendimiento y el peso del grano fue baja ($r = 0.27$) y sin significancia, resultado diferente con la significativa correlación reportada por Nunes *et al.* (2020) y Mesera *et al.* (2022), quienes de manera respectiva obtuvieron correlaciones de 0.27 ($p \leq 0.05$) y 0.29 ($p \leq 0.01$); no obstante, la baja relación y la nula significancia entre ambas variables es coincidente con Langat *et al.* (2019), pues reportan $r = 0.49$ y con Kalauni y Dhakal (2020) quienes señalan $r = 0.19$. La débil correlación positiva y la esporádica significancia se explican por la interacción negativa entre el peso de 100 granos con el número de granos por planta (Mesera *et al.*, 2022), granos por vaina (Kalauni y Dhakal, 2020) y con el número de vainas por planta (Langat *et al.*, 2019; Nunes *et al.*, 2020). Esto significa una menor asociación, debido a que la cantidad de granos por planta afecta el tamaño de los mismos. Las interacciones compensatorias entre los componentes del rendimiento en frijol son conocidas (Wu *et al.*, 2019), las cuales ocurren como resultado de la competencia por los fotosintatos (Sinclair, 2020).

Los genotipos Az. Noroeste y Mo 19-20-ERR2-12, de acuerdo con el peso de 100 granos (CIAT, 1987), presentan grano de tamaño mediano, mientras que el resto son de tamaño grande, esta característica es preferida por el consumidor y por lo tanto apreciada por los comercializadores. El tamaño proyectado de un lado del grano fue de 68.05 a 88.11 mm², éste representa un poco más de la mitad del área total de la testa reportada por Buzera *et al.* (2018), quienes indican desde 118.13 hasta 127.37 mm². El menor tamaño observado

Tabla 2. Rendimiento promedio de tres ciclos de producción y dimensiones del grano en dos variedades y tres líneas avanzadas de frijol, ciclo otoño-invierno, 2019/2020, Juan José Ríos, Sinaloa, México.

Table 2. Average yield of three production cycles and bean dimensions in two varieties and three advanced bean lines, fall-winter cycle, 2019/2020, Juan José Ríos, Sinaloa, México.

Genotipos	Rend. (t ha ⁻¹)	Tamaño (mm ²)	Peso 100 granos (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Perímetro (mm)	Circularidad (0-1)						
Mo19-20-ERR2-12	2.45	68.05	a	34.02	a	10.92	a	8.13	a	31.80	a	0.84	c
Azufrado Noroeste	2.14	76.66	b	38.53	b	12.25	b	8.31	b	34.39	b	0.81	ab
Azufrado Higuera	2.14	82.36	c	44.96	c	12.84	c	8.40	b	35.83	c	0.80	a
Mo 19-20-ERR2-11	2.36	83.56	c	45.06	c	12.71	c	8.56	c	35.74	c	0.82	b
Mo 19-20-ERR2-9	2.19	88.11	d	48.79	d	13.43	d	8.55	c	37.13	d	0.80	a
CV (%)	11.01	1.68	3.43	1.01	0.78	0.91	0.57						
DSH ($p \leq 0.05$)	NS	2.929	3.16	0.275	0.14	0.696	0.01						

Literales distintas por columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$); NS, no significativo; Rend., rendimiento promedio de tres ciclos de producción; CV, coeficiente de variación; DSH, diferencia significativa honesta.

en este estudio corresponde a la medición de un solo lado del grano, lo cual permite deducir que la superficie completa de éste es al menos el doble. El bajo coeficiente de variación en las dimensiones del grano de los genotipos (Tabla 2) denotó su uniformidad, aspecto importante en la comercialización por ser un indicador de la calidad física (Uebersax *et al.*, 2022).

La luminosidad del grano recién cosechado (lectura inicial) disminuyó después de 700 días de almacenamiento a 18 °C (lectura final). La disminución en las líneas avanzadas fue de entre 2.27 y 2.56 unidades (Tabla 3), un decremento equivalente al 3.95 % y 4.45 %. En la variedad Az. Noroeste, la disminución fue de 4.06 unidades (8.16 %) y en Az. Higuera, la merma fue de 4.52 unidades (7.10 %) (DSH = 0.94, $p \leq 0.05$). La pérdida de luminosidad en las variedades Az. Higuera y Az. Noroeste coincide con la reportada por Spitti *et al.* (2019) en tres variedades y 16 líneas de frijol, cuya reducción fue de entre 3.99 y 4.74 (7.70 % y 9.81 %) después de 90 d de almacenamiento a una temperatura promedio anual de 21.4 °C y humedad relativa (HR) ambiental. La velocidad de pérdida de luminosidad es asociada con las condiciones de almacenamiento, de acuerdo con Uebersax *et al.* (2022), el oscurecimiento se acelera con temperaturas y HR altas, también señalan que la calidad se mantiene estable al almacenar el grano con una HR del 75 % o menos y a temperaturas de 20 °C o inferiores. Sin embargo, también es posible que la pérdida acelerada se deba a la respuesta intrínseca de los genotipos.

Las líneas avanzadas mostraron reducción de 4.09 % en luminosidad y de 4.29 % en el brillo del grano, ambas características contrastan con la disminución respectiva de 7.63 % y 7.91 % observada en las variedades ($p \leq 0.05$). La respuesta de los genotipos de frijol al oscurecimiento u oxidación de la testa del grano puede ser de resistencia, regular o lenta (Duwadi *et al.*, 2018). En genotipos identificados como de oxidación lenta, evaluados por Spitti *et al.* (2019), la pérdida natural de luminosidad fue de entre el 7.70 % y el 9.81 %, mientras que en la variedad BRS-Pontal, identificada como de oscurecimiento lento, mostró una reducción de alrededor

del 12.0 % reportado por Siqueira *et al.* (2016). A partir de esta información, es factible inferir que las variedades Az. Noroeste y Az. Higuera presentan grano con oscurecimiento natural de la testa lento, pues tienen disminución de luminosidad similar a genotipos definidos con dicha respuesta.

La reducción natural en la luminosidad después de 180 d de almacenamiento, evaluada por Bento *et al.* (2020), en genotipos con oscurecimiento rápido (BRS-Estilo y BRS-Pontal) se observó una disminución del 15.40 %; en los de respuesta lenta (BRSMG-Madrepérola y CNFC 10467) el decremento fue de 7.50 % y en el resistente (frijol Pinto) del 2.50 %. La pérdida en este último es menor que en las tres líneas avanzadas aquí evaluadas, pero se obtuvo en un período de almacenamiento más corto. Esto indica que las tres líneas avanzadas presentan resistencia al oscurecimiento del grano. La reducción (7.50 %) de luminosidad en BRSMG-Madrepérola es similar a la reportada del 7.40 % por Siqueira *et al.* (2016) en esta variedad de oxidación lenta y también concuerda con la merma de luminosidad del 7.63 % en Az. Noroeste y Az. Higuera, lo cual reafirma el oscurecimiento lento ya observado en estas variedades.

La utilización de la pérdida relativa de luminosidad como un criterio práctico, mediante el establecimiento de un intervalo o umbral de referencia, facilitaría identificar la respuesta al oscurecimiento natural de la testa en el grano de frijol. En este sentido, al considerar tanto la información aquí obtenida como la de los estudios de Siqueira *et al.* (2016), Spitti *et al.* (2019) y Bento *et al.* (2020), resulta viable clasificar el grano como resistente cuando la pérdida entre la lectura inicial (recién cosechado) y la final sea menor o igual al 5.0 %, como de respuesta lenta cuando sea mayor al 5.0 % y menor o igual al 10.0 %, y de rápida cuando supere el 10.0 %. De acuerdo con Spitti *et al.* (2019), se requieren alrededor de 90 días de almacenamiento para poder diferenciar el oscurecimiento del grano entre genotipos. Este período es crucial para efectuar la lectura final; sin embargo, es importante recordar que el tiempo necesario para confirmar la respuesta genotípica depende de las condiciones ambientales en el

Tabla 3. Color y brillo (%) del grano en dos variedades y tres líneas avanzadas de frijol, ciclo otoño-invierno, 2019/2020, Campo Experimental Valle del Fuerte.

Table 3. Color and brightness (%) in two bean varieties and three advanced bean lines, fall-winter cycle, 2019/2020, Campo Experimental Valle del Fuerte.

Genotipos	RGB (Red, Green, Blue)				CIE Lab			Pérdida L
	Rojo	Verde	Azul	Brillo (%)	L	a	b	
Azufrado Noroeste	144.29 a	116.77 a	96.19 a	48.14 a	50.88 a	7.65 d	15.34 b	4.52 b
Azufrado Higuera	148.48 b	123.75 b	95.04 a	50.20 b	53.12 b	5.29 c	19.14 d	4.06 b
MO 19-20 ERR2-12	149.82 bc	128.85 c	108.24 c	52.11 c	54.90 c	4.72 b	14.06 a	2.56 a
MO 19-20 ERR2-11	151.07 c	129.21 c	105.43 b	52.22 c	55.04 c	4.65 b	15.89 b	2.27 a
MO 19-20 ERR2-9	154.93 d	134.90 d	109.28 c	54.16 d	57.01 d	3.55 a	16.49 c	2.29 a
CV (%)	0.46	0.74	1.05	0.65	0.62	3.51	1.68	13.65
DSH ($p \leq 0.05$)	1.51	2.05	2.36	0.73	0.74	0.4	0.595	0.94

Literales distintas por columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$); CV, coeficiente de variación; DSH, diferencia significativa honesta.

almacén, así como por el contenido de humedad del grano, como lo señalan Uebersax *et al.* (2022).

El brillo inicial de la testa tuvo un promedio de 54.47 % y fue diferente al 51.37 % obtenido después de 23 meses de almacenamiento ($p \leq 0.05$); asimismo, ocurrió con la luminosidad que al inicio fue de 57.33 y disminuyó hasta 54.19 ($p \leq 0.05$); es decir, la reducción del brillo fue de 3.10 unidades (5.69 %) y en luminosidad de 3.14 (5.48 %). La máxima pérdida de luminosidad, medida con AID, se registró en el grano de Az. Noroeste y fue del 8.16 %, disminución inferior que la observada por Jacinto *et al.* (2017) al medir, con un colorímetro Konica-Minolta modelo CM-5, el grano de las variedades Flor de Mayo M-38 y Flor de Durazno, cuya respectiva merma fue de 5.6 y 5.8 unidades, equivalente a poco más del 10.0 %. La diferencia en reducción de luminosidad se atribuye de manera principal a la respuesta genotípica, a las condiciones y al tiempo de almacenamiento, según Varga *et al.* (2019), tanto el colorímetro Minolta como el AID miden la luminosidad con resultados comparables. No obstante, resaltan que el AID destaca por facilitar medir otras características del grano además de la luminosidad.

La luminosidad del grano fue diferente entre los genotipos (DSH = 0.74, $p \leq 0.05$), la mayor luminosidad la mostró la línea Mo 19-20-ERR2-9 y la menor la variedad Az. Noroeste (Tabla 3). Las líneas avanzadas mostraron mayor luminosidad del grano con respecto a las variedades Az. Noroeste y Az. Higuera e incluso entre éstas existen diferencias ($p \leq 0.05$). El color del grano fue más amarillo y claro en las tres líneas, éste se reflejó en la mayor intensidad del rojo, verde y el azul, ya que la escala de grises va desde cero (negro) hasta 255 (blanco); es decir, cuando los valores del rojo, verde y el azul son altos el color es más claro y es más opaco cuando dichos valores son bajos (Dumka *et al.*, 2020).

El color amarillo en todos los genotipos es indicado por los valores positivos de las coordenadas amarillo-azul (b). El brillo mostró un comportamiento similar al de la luminosidad (Tabla 3), por lo tanto, es posible utilizarlo para evaluar el oscurecimiento de la testa. De acuerdo con Varga *et al.* (2019) las lecturas del colorímetro Minolta CR-400® (Konica Minolta Inc., Osaka, Japón) presentan estrecha correlación con el color obtenido con el AID, pero este último tiene la ventaja de medir, al mismo tiempo, las dimensiones y el color de cada grano, a diferencia del colorímetro que solo mide la luminosidad y lo hace a nivel de muestra. El coeficiente de variación en los valores relacionados con el color del grano fue bajo (Tabla 3), esto favorece la calidad física de esta leguminosa debido a la homogeneidad existente en la intensidad del color (Uebersax *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

El incremento de las dimensiones del grano y la menor reducción del brillo de la testa en las líneas Mo 19-20-ERR2-9 y Mo 19-20-ERR2-11 confirman la efectividad de la selección para mejorar la calidad física. El porcentaje de brillo y la luminosidad, obtenidos mediante el análisis de imágenes digitales, permiten identificar la respuesta de los genotipos al

oscurecimiento natural de la testa. La oxidación de la testa es lenta en las variedades Azufrado Noroeste y Azufrado Higuera; mientras que las líneas avanzadas de frijol tipo azufrado Mo 19-20-ERR2-9, Mo 19-20-ERR2-11 y Mo 19-20-ERR2-12 presentan resistencia.

REFERENCIAS

- Acosta, G.J.A., Jiménez, H.Y., Montero, T.V., Guzmán, M.S.H. y Anaya, L.J.L. 2016. San Rafael, nueva variedad de frijol pinto de reacción neutral al fotoperiodo para el centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(3): 717-722.
- Anaya, J.L., Ibarra, F.J., Rodríguez, F.G., Ortega P.F., Acosta, J.A. y Chiquito, E. 2021. Leguminosas de grano en México: variedades mejoradas de frijol y garbanzo desarrolladas por el INIFAP. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12(25): 63-75.
- Ayala, A.V., Acosta, J.A. y Reyes, L. 2021. El cultivo del frijol presente y futuro para México. Libro Técnico No. 1. INIFAP. CIRCE. Campo Experimental Bajío. Celaya Gto. México. 232 p.
- Bento, A.C., Lanna, A.C., Bassinello, P.Z., Oomah, B.D., Pimenta, E.B., Carvalho, R.N. y Moreira, A.S. 2020. Aging indicators for stored carioca beans. *Food Research International* 134: 109249.
- Buzera, A., Kinyanjui, P., Ishara, J. y Sila, D. 2018. Physical and cooking properties of two varieties of bio-fortified common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in DR Congo. *Food Science and Quality Management* 71: 2225-0557.
- CIAT. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Schoonhoven, A. van y Pastor-Corrales, M. A. (comps.) Centro Internacional de Agricultura Tropical Cali, Colombia. 56 p.
- Delfini, J., Moda, V., CdF. Ruas, dos Santos J., Ruas P.M., Buratto J., Ruas, E.A. y Gonçalves, L. S. 2017. Distinctness of Brazilian common bean cultivars with carioca and black grain by means of morphoagronomic and molecular descriptors. *PLoS ONE* 12(11): e0188798.
- Dumka, A., Ashok, A., Verma, P. y Verma, P. 2020. Advanced digital image processing and its applications in big data (1st ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Duwadi, K., Austin, R.S., Mainali, H.R., Bett, K., Marsolais, F. y Dhaubhadel, S. 2018. Slow darkening of pinto bean seed coat is associated with significant metabolite and transcript differences related to proanthocyanidin biosynthesis. *BMC Genomics* 19(1): 1-13.
- Ferreira, T., y Rasband, W. 2012. ImageJ user guide: IJ 1.46 r revised edition. [Consultado 10 enero 2022]. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Hu, Y. y Zhang, Z. 2021. GridFree: a python package of image analysis for interactive grain counting and measuring. *Plant Physiology* 186 (4): 2239-2252.
- Jacinto, H.C., Bernal, L.I., Garza, G.R., y Garza, G.D. 2017. Cambios poscosecha en frijol durante el almacenamiento prolongado en contraste con el envejecimiento acelerado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(8): 1827-1837.
- Kalauni, S. y Dhakal, D. 2020. Correlation and path coefficient analysis of seed yield and yield components of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in sub-tropical region. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 8(9): 1928-1934.

- Klāsener, G. R., Ribeiro, N. D., y Da Silva Argenta, H. 2022. Genetic divergence and selection of bean cultivars of different grain types based on physical traits. *Revista Ciencia Agronomica*, 53: e20217820.
- Langat, C., Ombori, O., Leley, P., Karanja, D., Cheruiyot, R., Gathaara, M. y Masila, B. 2019. Genetic variability of agronomic traits as potential indicators of drought tolerance in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Agronomy*, Article ID 2360848.
- Mesera, E., Shifaraw, G., Alamerew, S. y Amsalu, B. 2022. Genetic variability analysis and association of traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces collected from Ethiopia at Jimma. *Advances in Agriculture*, Article ID 4400711.
- Nunes, H.D., Leal, F.T., Mingotte, F.L.C., Damião, V.D., Junior, P.A.C. y Lemos, L.B. 2020. Agronomic performance, quality and nitrogen use efficiency by common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 44(7): 995-1009.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Rosales, S.R. y Flores, G. H. 2022. PID 1: Variedad de frijol pinto con semillas de oscurecimiento lento para riego en Durango, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 45(1):145-147.
- Rosales, S.R., Nava, C.A., González, H., Herrera, M.D., Jiménez, J.C., Ramírez, N.Y. y Osuna, E.S. 2014. Rendimiento, preferencia y calidad de enlatado de variedades de frijol pinto producidas en Durango, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(2): 309-315.
- Salinas, P.R.A., Rodríguez, C.F.G., Padilla, V.I., Valencia, M.Y., Ortiz, C.H.G. y Acosta, G.J.A. 2012. Janasa, nueva variedad de frijol tipo azufrado para el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(2): 397-402.
- Sinclair, T. R. 2020. "Basis of yield component compensation in crop plants with special reference to field bean, *Phaseolus vulgaris*" by M. Wayne Adams, *Crop Science* (1967) 7, 505-510. *Crop Science* 61(2): 863-865.
- Siqueira, B. dos S., Bassinello, P. Z., Santos, S. C., Malgaresi, G., Ferri, P. H., Rodriguez, A. G., y Fernandes, K. F. 2016. Do enzymatic or non-enzymatic pathways drive the postharvest darkening phenomenon in carioca bean tegument? *LWT - Food Science and Technology* 69: 593-600.
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). 2017. Guía técnica para la descripción varietal. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). 2a (Ed.). SAGARPA. SNICS. Coyoacán, Cd. de México. 36 p.
- Spitti, A.M.D.S., Carbonell, S.A.M., Dias, C.T.D.S., Sabino, L.G., Carvalho, C.R.L. y Chiorato, A.F. 2019. Carioca bean genotypes for tolerance to grain darkening by natural and accelerated methods. *Ciência e Agrotecnologia* 43:e012519.
- Uebersax, M. A., Siddiq, M., Cramer, J. y Bales, S. 2022. Harvesting, postharvest handling, distribution, and marketing of dry beans. In: *Dry Beans and Pulses: Production, Processing, and Nutrition* (Second ed.). M. Siddiq and M. A. Uebersax (Eds.), pp. 81-104. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- UPOV. 2013. Technical Working Party on Automation and Computer Programs- Revision of Document TGP/8: Part II: Techniques Used in DUS Examination, New Section: Examining Characteristics Using Image Analysis. International Union for the Protection of new Varieties of Plants. Seoul, Republic of Korea. 27 p. [Consultado 10 enero 2022]. Disponible en: http://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/twc_31/twc_31_20.pdf
- UPOV. 2015. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad, para judía común, Alubia (*Phaseolus vulgaris*). Documento TG/12/9 Rev. 2, International Union for the Protection of new Varieties of Plants. Ginebra, Suiza. 47 p. [Consultado 10 enero 2022]. Disponible en: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg012.pdf>
- Varga, F., Vidak, M., Ivanović, K., Lazarević, B., Širić, I., Srećec, S., Šatović, Z. y Carović, K. 2019. How does Computer vision compare to standard colorimeter in assessing the seed coat color of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)?. *Journal of Central European Agriculture* 20(4): 1169-1178.
- Wallander-Compean, L., Almaraz-Abarca, N., Alejandro-Iturbide, G., Uribe-Soto, J.N., Ávila-Reyes, J.A., Torres-Ricario, R., Herrera-Arrieta, Y. y Delgado-Alvarado, E.A. 2022. Variación fenológica y morfométrica de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) de cinco poblaciones silvestres de Durango, México. *Botanical Sciences* 100(3): 563-578.
- Wu, J., Wang, L., Fu, J., Chen, J., Wei, S., Zhang, S., Zhang, J., Tang, Y., Chen, M., Zhu, J., Lei, L., Geng, Q., Liu, C., Wu, L., Li, X., Wang, X., Wang, Q., Wang, Z., Xing, S., Zhang, H., Blair, M.W. y Wang, S. 2019. Resequencing of 683 common bean genotypes identifies yield component trait associations across a north-south cline. *Nature Genetics*, 52(1): 118-125.
- Ziegler, V., Paraginski, R.T. y Ferreira, C.D. 2021. Grain storage systems and effects of moisture, temperature and time on grain quality-A review. *Journal of Stored Products Research* 91: 101770.

Diseños factoriales completos de experimentos para optimizar un ELISA que detecta anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 en leche materna

Full factorial designs of experiments to optimize an ELISA that detects SARS-CoV-2 anti-RBD antibodies in breast milk

Maylin Pérez-Bernal^{1*}, Carlos A. Hernández¹, Rafael Ibargollín¹, Midalis Martínez², Migdiala Soria², Magali Delgado¹, Enrique Pérez¹, José M. Sánchez-Ríos¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Circunvalante Norte, Olivos 3, Sancti Spíritus, Cuba.

² Servicio de Neonatología, Hospital General "Camilo Cienfuegos", Bartolomé Masó 128, Sancti Spíritus, Cuba.

RESUMEN

En este trabajo se optimizó un ELISA, mediante la aplicación de diseños factoriales completos de experimentos, para detectar anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2 en leche materna de púérperas que recibieron durante el embarazo tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala, basada en la plataforma de subunidades proteicas. A partir de un protocolo preliminar no optimizado, se evaluaron las interacciones entre los factores y niveles en el paso de recubrimiento de la placa con el antígeno RBD y en el paso de reacción del antígeno con los anticuerpos de la leche; se determinó además el factor dilución para aplicar el conjugado enzimático en el ensayo. Se estableció la combinación óptima de factores y niveles para conformar el protocolo optimizado del ELISA, con el que se logró incrementar 4,67 veces la relación señal/ruido del ensayo respecto al no optimizado. El nuevo protocolo garantizará la detección de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2 en las muestras de leche materna con bajo contenido de estos anticuerpos y que probablemente tuvieran una señal de absorbancia cercana al blanco del ensayo si se aplicara el ELISA no optimizado.

Palabras clave: diseño experimental, eta-cuadrado parcial, tamaño del efecto, vacuna Abdala

ABSTRACT

In this work, an ELISA was optimized through the application of full factorial designs of experiments, to detect IgA anti-RBD antibodies to SARS-CoV-2 in breast milk of puerperal women who received, during pregnancy, three doses of the Abdala anti-COVID-19 vaccine, created on the protein subunit platform. Based on a preliminary non-optimized protocol, the interactions between the factors and levels, at the step of RBD antigen coating of the plate and in the reaction of the antigen with the breast milk antibodies, were evaluated; the dilution factor to apply the enzyme conjugate in the assay was also determined. The optimized ELISA protocol was established with the best combination of factors and levels, with which it was possible to increase the signal to noise ratio of the assay by 4.67 times compared to the non-optimized one. The new protocol will guarantee the detection of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies in breast milk samples with a low content of these antibodies and that would probably

have an absorbance signal close to the assay blank if the non-optimized ELISA were applied.

Keywords: Abdala vaccine; effect size; experimental design; partial eta-square

INTRODUCCIÓN

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es un método analítico de uso común basado en la unión específica antígeno-anticuerpo. Este ensayo ha sido de importancia trascendental en la medicina humana, para detectar tanto antígenos como anticuerpos, y ha tenido gran aplicación en el diagnóstico *in vitro* debido a su alta especificidad y sensibilidad (Peng *et al.*, 2022). El ELISA jugó un rol crucial en la reciente pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2, tanto para el estudio de la respuesta inmune a la enfermedad COVID-19, como para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas que se generaron para proteger a las personas de la enfermedad grave y la muerte (Ashmawy *et al.*, 2022; Ramírez-Reveco *et al.*, 2023).

En la actualidad, los investigadores que trabajan en proyectos relacionados con este coronavirus tienen acceso a una amplia gama de kits ELISA listos para usar. Sin embargo, cuando un kit no está disponible para el objetivo específico de interés, los laboratorios deben desarrollar y optimizar su propio ELISA. Dado que es un inmunoensayo que consta de varios pasos, numerosos factores deben ser probados durante la optimización, como el tipo de placa, la concentración de antígeno o anticuerpo para el recubrimiento, la temperatura y el tiempo de incubación en cada paso, los tampones utilizados, entre otros (Minic y Zivkovic, 2020).

Estos experimentos de optimización requieren mucho tiempo y son difíciles de realizar si se aplica la estrategia tradicional de evaluar un factor a la vez, mientras los demás factores permanecen sin cambios (OFAT, One-Factor-At-a-Time, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el Diseño de Experimentos (DOE, por sus siglas en inglés) es un método útil para identificar y optimizar los factores significativos y lograr resultados adecuados utilizando la mínima cantidad posible de ensayos experimentales (Ahmed *et al.*, 2022). Es un enfoque sistemático y basado en estadísticas donde se evalúan diferentes factores simultáneamente (Ray *et al.*, 2009; Tsoi *et al.*, 2014; Augustine *et al.*, 2015; Rodríguez

*Autor para correspondencia: Maylin Pérez Bernal
 Correo-e: maylin.perez@cigb.edu.cu

Recibido: 30 de marzo de 2023

Aceptado: 5 de junio de 2023

Publicado: 21 de septiembre de 2023

et al., 2022). La efectividad de este diseño radica en que, a diferencia de la práctica estándar de variar solo un factor a la vez, tanto los efectos principales de cada factor como las interacciones entre ellos pueden ser interpretados realizando menos experimentos en menos tiempo que el que requeriría el OFAT (Papaneophytou, 2019).

Por lo general, el método DOE se puede dividir en diseño factorial completo y diseño factorial fraccionado, conocido también como Diseño Experimental de Taguchi. Este último solo utiliza un subconjunto seleccionado de los niveles, considerando que algunas interacciones no son tan significativas como los efectos principales, pero esto puede llevar a que los resultados sean únicamente relativos y no identifiquen exactamente qué nivel tiene el mayor efecto (Arias-Nava *et al.*, 2015). En cambio, en el DOE factorial completo se prueban todas las combinaciones de los factores y niveles y todas sus interacciones, lo que conduce a una interpretación más completa de los resultados. Como se incluyen todas las combinaciones posibles, proveen un número elevado de grados de libertad para el error experimental, con la consiguiente ventaja que esto representa (Tsoi, 2014; Kechagias *et al.*, 2020). Pero, a pesar de sus ventajas y resultados confiables, el DOE factorial completo se ha utilizado con poca frecuencia para optimizar los inmunoensayos. Es una deficiencia que fue planteada por Ray y colaboradores en el 2009, y que persiste hasta la actualidad.

El objetivo de este trabajo fue optimizar un ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-RBD (RBD: sitio de unión al receptor de la proteína espícula del SARS-CoV-2), de isotipo IgA, en muestras de leche materna de puérperas que recibieron, durante el embarazo, tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala, basada en la plataforma de subunidades proteicas. Como son muy escasas las publicaciones científicas que han descrito los niveles de anticuerpos que genera este tipo de vacuna en leche materna, y que podrían conferir inmunidad pasiva contra la COVID-19 a la población vulnerable de neonatos y lactantes, es imprescindible contar con un ensayo eficaz que detecte estos anticuerpos. Por esta razón, la optimización se realizó aplicando DOEs factoriales completos en varias etapas del ELISA. Se evaluaron las interacciones entre los factores y niveles en cada etapa para determinar, en el menor tiempo posible, la mejor combinación de estos para conformar el protocolo optimizado del ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las muestras de leche materna se colectaron de 103 puérperas vacunadas durante el embarazo con tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala. Se obtuvo por escrito el consentimiento informado de todas las participantes antes de colectar la leche materna. Las muestras se obtuvieron en el Servicio de Neonatología del Hospital General "Camilo Cienfuegos", Sancti Spiritus, Cuba, entre septiembre y noviembre de 2021. La colecta se realizó mediante extracción manual directamente a un recipiente estéril, descartando las prime-

ras 4 - 5 gotas. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis. Como controles negativos se utilizaron muestras de leche materna de puérperas no vacunadas y que refirieron no haberse infectado con COVID-19.

Para recubrir las placas ELISA se utilizó como antígeno la RBD recombinante del SARS-CoV-2, suministrada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, con una pureza mayor al 98 %. La secuencia de esta RBD fue igual a la de la cepa SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (NCBI Acc. No.YP_009724390) (Limonta-Fernández *et al.*, 2022).

Optimización del ELISA

Se utilizaron dos mezclas de las muestras de leche materna, de quince puérperas cada una, identificadas con bajo (BAC) y alto (AAC) contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, de acuerdo a los valores de la señal de absorbancia (A 492 nm) obtenidos con un ELISA preliminar no optimizado. Para hacer la mezcla BAC se seleccionaron muestras con $A_{492\text{ nm}} \leq 0.300$; las muestras que conformaron la mezcla AAC tenían valores de $A_{492\text{ nm}} \geq 1.500$.

El ELISA preliminar (no optimizado) se realizó de la siguiente forma: se utilizaron placas multipocillos de alta unión (Costar® 3590, Estados Unidos) que fueron recubiertas con 100 μL /pocillo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RBD diluida en tampón carbonato-bicarbonato (ThermoFisher, Alemania) 100 mM (pH 9.6) y se colocó 3 h en una incubadora a 37°C (RETOMED, Cuba). A continuación, las placas pasaron por un lavador MW-2001 PROWASH (Tecnosuma Internacional, Cuba), donde se aplicaron tres lavados con 380 μL /pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7.4) con 0.05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Este tampón se utilizó para los pasos de lavado de todos los ELISAs realizados en este trabajo. Luego, los pocillos se bloquearon con 380 μL de la solución de PBS con albúmina de suero bovino (BSA, Applichem, Alemania) al 3 % (p/v) durante 1 h a 37°C . Después de un lavado se agregaron 100 μL /pocillo de las mezclas de leche materna, diluidas 1:100 en tampón de dilución, que consistió en PBS con BSA al 2 % (p/v). Los ensayos fueron realizados por triplicado. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente (TA) y al cabo de ese tiempo se lavó tres veces. Se aplicaron 100 μL /pocillo del conjugado anti-IgA humana CBSSIgAH-HRP (CIGB, Sancti Spiritus, Cuba) diluido 1:8000 con tampón de dilución y se dejó la placa 1 h a 37°C . Después de tres lavados, la placa se incubó en la oscuridad con 100 μL /pocillo de ortofenilendiamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (0.5 mg/mL) disuelta en ácido cítrico (Merck, Alemania) 0.0243 M, hidrógeno fosfato disódico (Merck, Alemania) 0.0514 M y peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 0.015 % (p/v), durante 20 min a TA. La reacción colorimétrica fue interrumpida agregando 100 μL /pocillo de ácido sulfúrico (EMSURE, Estados Unidos) 2 M y se midió la A492nm en un lector de placas (Labsystems Multiskan Plus, Estados Unidos).

A partir de este protocolo inicial se realizó la optimización de varios pasos del ELISA mediante experimentos factoriales completos, que serán descritos a seguidas.

Recubrimiento de la placa ELISA

En esta primera etapa del ELISA se utilizó un diseño factorial completo 3x2x2x2, donde se probaron los siguientes factores y niveles: concentración del antígeno de recubrimiento, RBD: 3.0; 5.0 y 10 µg/mL; tampón de recubrimiento: carbonato-bicarbonato (50 mM; pH 9,6) y PBS (pH 7,4); temperatura de incubación: TA y 37 °C; tiempo de incubación: 2 h y 3 h; tipo de placas multipocillos de alta unión: Costar® 3590 y Nunc MaxiSorp® (Estados Unidos).

El diseño utilizado para las placas, teniendo en cuenta estos factores y niveles, fue el siguiente: se recubrieron cuatro placas de cada tipo, una para cada combinación de tiempo/temperatura: 2 h/TA; 3 h/TA; 2 h/37 °C; 3 h/37 °C. La mitad de cada placa se recubrió usando PBS y la otra mitad usando tampón carbonato-bicarbonato. En ambas mitades se colocaron dos columnas por cada concentración de RBD. Se prepararon tres réplicas de las mezclas de leche materna y se añadieron a las placas por duplicado para cada tratamiento ensayado. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces, y luego continuaron los pasos sucesivos según el ELISA preliminar.

Paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA específicos de las mezclas de leche materna

Para esta evaluación se aplicaron las condiciones óptimas obtenidas para el recubrimiento. En esta etapa se usó un diseño factorial completo 3x2x2, con los siguientes factores y niveles: concentración de BSA en el tampón de dilución: 1 %, 2 % y 3 %; temperatura de incubación: TA y 37 °C; tiempo de incubación: 1 h y 2 h. Las dos mezclas de leche materna fueron diluidas 1:100 con tampón de dilución, consistente en PBS con BSA a la concentración evaluada en cada tratamiento.

Atendiendo a estos factores y niveles, se preparó la siguiente distribución en las placas: se utilizaron cuatro placas, una para cada combinación de tiempo-temperatura: 1h/TA; 2h/TA; 1h/37 °C; 2h/37 °C. Las placas se dividieron en tres secciones, una para cada concentración de BSA. Se prepararon seis réplicas de las mezclas de leche materna y se añadieron por duplicado por cada tratamiento evaluado. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron tres veces y el ELISA continuó según el protocolo preliminar.

Determinación de la dilución del conjugado CBSIgAH-HRP

En esta evaluación se aplicaron las condiciones óptimas definidas en las dos etapas anteriores y se utilizó solamente la mezcla de leche materna AAC IgA anti-RBD. Para diluir el conjugado se usó el tampón de dilución con el porcentaje de BSA de mejores resultados en el paso anterior. Se ensayaron ocho diluciones seriadas 1:2 (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000) a razón de 100 µL/pocillo. Se colocaron tres repeticiones de cada dilución en la placa, y se incubó 1 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se lavó tres veces. Las condiciones para la reacción enzima-sustrato y para detener esta reacción se mantuvieron iguales a las del ELISA preliminar.

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se realizó con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales, versión 21.0 (SPSS, por sus siglas en inglés). La variable de respuesta utilizada para la optimización del ELISA, con las mezclas de leche materna AAC y BAC IgA anti-RBD, fue la relación señal/ruido (S/R), que es el cociente entre la señal A 492 nm de las mezclas, corregida con el blanco del ensayo, y la señal del blanco. La solución de PBS con la correspondiente concentración (%) de BSA se utilizó como blanco en los ensayos. Las medias de S/R se obtuvieron de la salida del programa SPSS. La mejor combinación de factores para cada paso del ELISA se definió como aquella con el mayor valor de la media de S/R.

Un ANOVA factorial completo se aplicó para evaluar la significancia estadística ($p \leq 0.05$) de los efectos principales de cada factor y de la interacción entre los factores. Los tamaños del efecto se determinaron utilizando el estadístico Eta-cuadrado parcial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el inicio del estudio, con la aplicación del ELISA preliminar no optimizado para identificar las muestras de leche materna AAC y BAC anti-RBD, se comprobó que los controles negativos, que fueron las muestras colectadas de puérperas no vacunadas con Abdala y que refirieron no haberse enfermado de COVID-19, dieron lecturas de A 492 nm similares al blanco del ensayo. Lo que confirmó que eran muestras negativas y que no existieron señales inespecíficas que podrían dar lugar a falsos positivos. Estos controles se mantuvieron en todas las placas ELISA a lo largo del proceso de optimización y se observó siempre la misma señal de A 492 nm cercana al blanco.

La figura 1 muestra el tamaño del efecto de las 26 interacciones entre los cinco factores evaluados en la etapa de recubrimiento, tanto para la mezcla BAC como para la AAC. Solo tres de estas interacciones, las de menor tamaño de efecto, fueron no significativas para ambas mezclas y los valores de p de cada una se indican en la figura 1. La interacción de segundo orden entre tampón de recubrimiento–concentración del antígeno de recubrimiento–tipo de placa fue la más importante, con el mayor valor de Eta-cuadrado parcial, que fue coincidentemente 0.996 en BAC y AAC.

Las interacciones temperatura–tipo de placa, tampón de recubrimiento–temperatura–tipo de placa y concentración del antígeno de recubrimiento–temperatura–tipo de placa, fueron las que siguieron en orden descendente de magnitud del tamaño del efecto, tanto para bajo como alto contenido de anticuerpos. Los valores de Eta-cuadrado parcial se mantuvieron muy altos, por encima de 0.90 en estas tres interacciones; en la última de ellas fueron de 0.934 para BAC (Figura 1A) y 0.958 para AAC (Figura 1B).

Recientemente Hernández *et al.* (2023) optimizaron un ELISA sándwich cuantitativo mediante un diseño factorial completo similar al que se presenta en este trabajo. Es el único que se ha publicado hasta la fecha con un diseño que concibe la optimización paso a paso para incorporar suce-

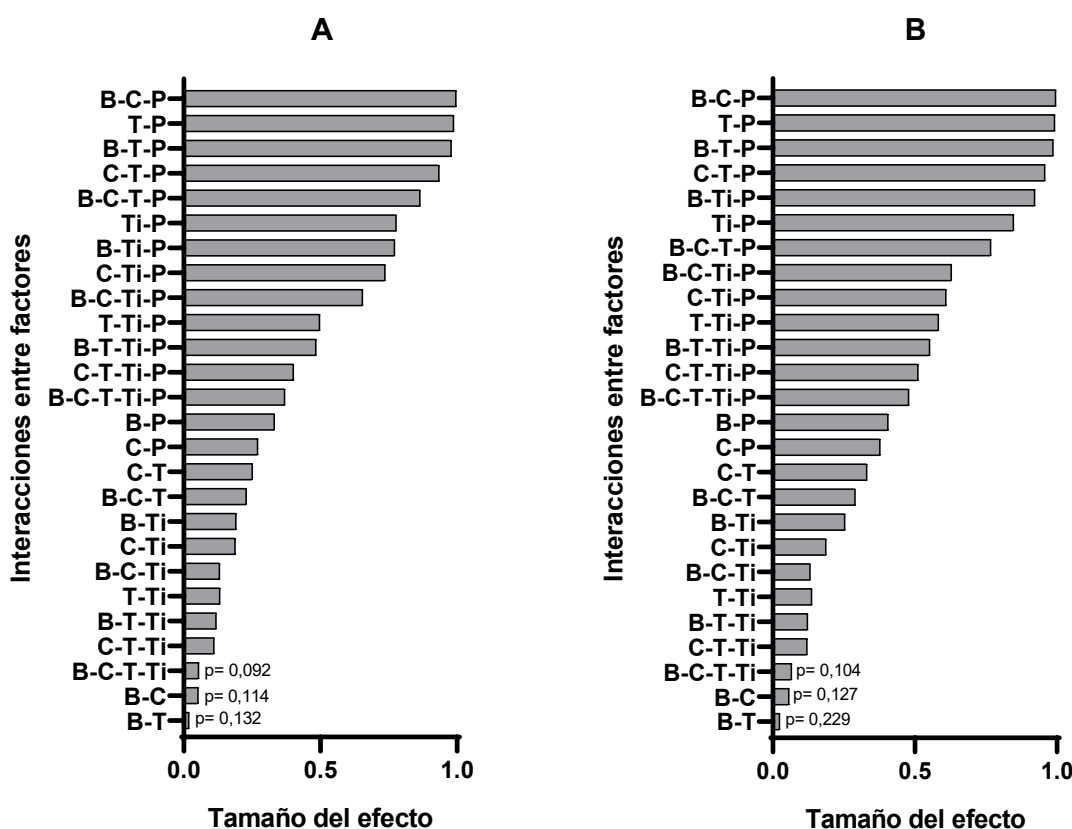


Figura 1. Tamaños del efecto de las interacciones entre los factores evaluados en el recubrimiento de la placa ELISA. C: concentración del antígeno de recubrimiento, RBD; B: tampón de recubrimiento; T: temperatura de incubación; Ti: tiempo de incubación; P: tipo de placa. (A) Mezcla de leche materna con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD (B) Mezcla de leche materna con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD. La variable de respuesta fue la relación señal/ruido, que es el cociente entre la señal A492nm de las mezclas de leche corregida con el blanco y la señal del blanco. El tamaño del efecto de las interacciones factoriales se midió según el Eta-cuadrado parcial de un ANOVA factorial completo 3x2x2x2x2. La significancia estadística se fijó en 0.05.

Figure 1. Effect sizes of the interactions between the factors evaluated in the coating of the ELISA plate. C: coating antigen concentration, RBD; B: coating buffer; T: incubation temperature; Ti: incubation time; Q: plate type. (A) Mixture of breast milk with low IgA anti-RBD antibodies content (B) Mixture of breast milk with high IgA anti-RBD antibodies content. The response variable was the signal to noise ratio, which is the ratio between the A492nm signal of the blank-corrected milk mixtures and the blank signal. The effect size of factorial interactions was measured by partial Eta-square of a 3x2x2x2x2 full factorial ANOVA. Statistical significance was set at 0.05.

sivamente al protocolo la mejor combinación de factores y niveles como se ha hecho en nuestro estudio. Estos autores afirmaron que las interacciones más importantes en el paso de recubrimiento se establecieron entre tampón–concentración de recubrimiento, concentración de recubrimiento–tipo de placa y concentración de recubrimiento–temperatura. Los valores de Eta-cuadrado parcial de estas interacciones estaban en el rango de 0.50 a 0.87 y de 0.61 a 0.92 para bajas y altas concentraciones de antígeno, respectivamente.

El Eta-cuadrado parcial es una forma de medir el tamaño del efecto de diferentes factores en modelos ANOVA y su valor siempre está comprendido entre 0 y 1 (Ben-Shachar *et al.*, 2020). Se considera que un Eta-cuadrado parcial superior a 0.14 significa un efecto grande (Cohen, 1988). En la mayoría de las interacciones evaluadas en nuestro trabajo, el tamaño del efecto estuvo por encima de ese valor (Figura 1). Los valores cercanos a 1 indican que hay gran relación entre los factores (Ben-Shachar *et al.*, 2020), por lo que en las cuatro

primeras interacciones con mayor tamaño de efecto existe una estrecha relación entre los factores que las integran. A diferencia del trabajo de Hernández *et al.* (2023), donde la concentración de recubrimiento fue el factor que estuvo presente en las interacciones más importantes en ese paso del ELISA, en nuestro estudio fue el tipo de placa el factor que se mantuvo en las quince primeras interacciones con mayor tamaño del efecto. Esto significa que, para este ELISA, es preciso garantizar la disponibilidad del tipo de placa con mejores resultados para asegurar un paso de recubrimiento óptimo.

En la Tabla 1 se presentan los valores de S/R para todas las combinaciones de factores y niveles que fueron ensayados en esta etapa. Con estos datos fue posible definir la mejor combinación a aplicar para muestras con AAC y BAC anti-RBD: usar la placa Costar 3590, el antígeno de recubrimiento a 10 µg/mL disuelto en tampón carbonato/bicarbonato (50 mM; pH 9.6) y hacer la incubación durante 2 h a 37 °C. Con estas

Tabla 1. Relaciones señal/ruido calculadas para las mezclas de leche materna con bajo y alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, aplicando un diseño factorial completo 3x2x2x2 en la etapa de recubrimiento de la placa ELISA.

Table 1. Signal to noise ratios calculated for breast milk mixtures with low and high content of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies, applying a 3x2x2x2 full factorial design in the ELISA plate coating step.

Mezcla de bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2							
Placa	Tiempo/ Temperatura	Carbonato/Bicarbonato			PBS		
		RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL	RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL
Costar	2 h/TA	1.84	2.31	5.64	1.30	2.21	3.19
	3 h/TA	1.85	2.76	5.69	1.57	3.54	4.28
	2 h/37 °C	2.30	4.95	9.96	4.00	5.36	7.73
	3 h/37 °C	2.29	2.89	5.87	1.49	2.26	4.30
Nunc	2 h/TA	1.73	2.76	3.68	1.21	2.11	3.25
	3 h/TA	2.11	3.14	5.82	1.71	2.24	4.19
	2 h/37 °C	1.98	3.20	4.13	2.32	2.79	3.47
	3 h/37 °C	2.14	3.35	5.97	1.59	2.25	4.16

Mezcla de alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2							
Placa	Tiempo/ Temperatura	Carbonato/Bicarbonato			PBS		
		RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL	RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL
Costar	2 h/TA	5.40	6.15	12.93	4.33	7.97	11.58
	3 h/TA	5.70	9.70	20.73	4.58	14.46	21.25
	2 h/37 °C	5.87	9.50	30.07	8.62	15.07	22.26
	3 h/37 °C	5.41	7.80	20.80	4.58	14.60	21.21
Nunc	2 h/TA	4.36	7.07	10.23	4.29	6.22	10.62
	3 h/TA	9.36	11.48	10.27	5.71	8.27	11.22
	2 h/37 °C	6.47	9.86	10.55	7.41	8.94	11.38
	3 h/37 °C	5.02	7.77	11.68	5.37	12.34	14.92

condiciones se lograron los valores más altos de S/R: 9.96 para BAC y 30,07 para AAC. La tabla 1 también muestra que con las condiciones de recubrimiento del ELISA preliminar se obtuvo una S/R = 2.89 para BAC y S/R = 7.80 para AAC. O sea, que después de la optimización mediante el DOE factorial completo, el valor de S/R se incrementó 3.45 veces para BAC y casi 4 veces para AAC. El tipo de placa y el tampón con mejores resultados coincidieron con los utilizados en el protocolo preliminar, pero en los otros tres factores evaluados los niveles óptimos fueron diferentes. Por tanto, la evaluación simultánea de múltiples factores y niveles, con el DOE aplicado, fue válida para detectar en el menor tiempo posible cuáles debían cambiarse y cuáles no en esta primera etapa del ELISA.

La optimización del paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA específicos de las mezclas de leche materna ya tuvo incorporadas las mejores condiciones determinadas previamente para el recubrimiento. Se comprobó que tanto el tamaño del efecto de cada factor individual como de sus interacciones fueron significativos, excepto la interacción entre el tiempo y la temperatura, con $p = 0.196$ para BAC y $p = 0.158$ para AAC (Figura 2). El factor con el valor más alto

de Eta-cuadrado parcial fue la concentración de BSA en el tampón de dilución, y todas las interacciones donde se involucró este factor con los demás factores evaluados fueron las de mayor tamaño de efecto. El comportamiento fue el mismo para las dos mezclas de leche materna evaluadas en el trabajo. Estos resultados coinciden con los de Hernández *et al.* (2023), que también encontraron como un factor clave la concentración de agente bloqueador usado en el tampón de dilución, la leche descremada en ese caso, en interacción con otros factores.

El hallazgo de que la concentración de BSA en el tampón de dilución fue el factor con mayor tamaño de efecto, se corresponde directamente con los resultados expuestos la Tabla 2. Cuando se usó 1 % de BSA los valores de la relación S/R fueron los más altos, independientemente de cuáles eran la temperatura o el tiempo de incubación utilizados. Ya se había comprobado que no fue significativa la interacción entre estos dos factores (Figura 2). Nótese que la S/R máxima, tanto para la mezcla BAC como para la AAC, se logró con 1 % de BSA en el tampón de dilución e incubando la placa durante 1h a 37 °C (Tabla 2). En estas condiciones se duplicó el valor de S/R respecto al ELISA preliminar, por tanto, esa fue

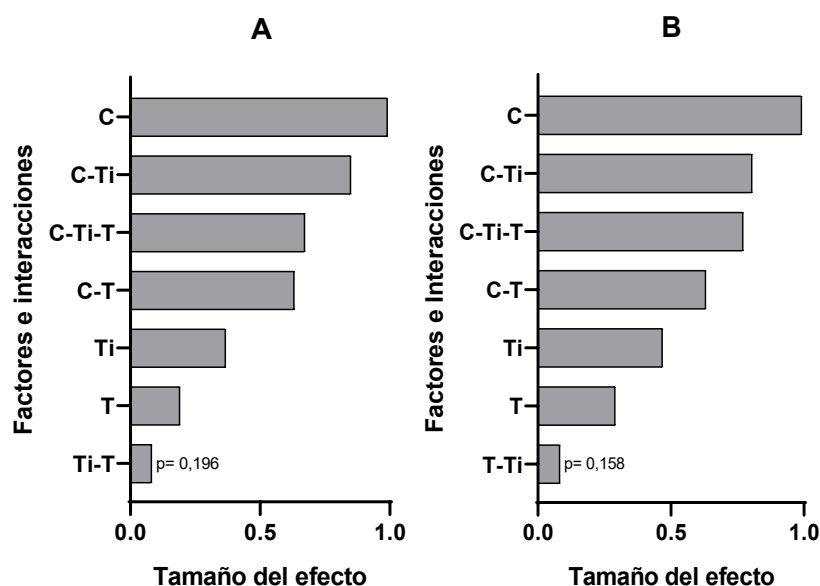


Figura 2. Tamaños del efecto de los factores y sus interacciones en el paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA anti-RBD de las mezclas de leche materna. C: Concentración de albúmina de suero bovino en el tampón de dilución; T: temperatura de incubación; Ti: tiempo de incubación. (A) Mezcla de leche materna con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD (B) Mezcla de leche materna con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD. La variable de respuesta fue la relación señal/ruido, que es el cociente entre la señal A492nm de las mezclas de leche corregida con el blanco y la señal del blanco. El tamaño del efecto de las interacciones factoriales se midió según el Eta-cuadrado parcial de un ANOVA factorial completo 3x2x2. La significancia estadística se fijó en 0.05.

Figure 2. Effect sizes of the factors and their interactions in the RBD antigen binding step to anti-RBD IgA antibodies from breast milk mixtures. C: Bovine serum albumin concentration in the dilution buffer; T: incubation temperature; Ti: incubation time. (A) Mixture of breast milk with low IgA anti-RBD antibodies content (B) Mixture of breast milk with high IgA anti-RBD antibodies content. The response variable was the signal to noise ratio, which is the ratio between the A492nm signal of the blank-corrected milk mixtures and the blank signal. The effect size of factorial interactions was measured as the partial Eta-square of a 3x2x2 full factorial ANOVA. Statistical significance was set at 0.05.

Tabla 2. Relaciones señal/ruido calculadas para las mezclas de leche materna con bajo y alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, aplicando un diseño factorial completo 3x2x2 en el paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos específicos de las mezclas.

Table 2. Signal to noise ratios calculated for breast milk mixtures with low and high content of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies, applying a 3x2x2 full factorial design in the RBD antigen binding step to specific antibodies of the mixtures.

Mezcla de leche materna	Tiempo/ Temperatura	Concentración de BSA en el tampón de dilución		
		1 %	2 %	3 %
Con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD	1 h/TA	8.18	8.08	7.87
	2 h/TA	8.77	7.14	8.86
	1 h/37 °C	15.86	7.22	8.73
	2 h/37 °C	8.13	7.08	9.50
Con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD	1 h/TA	26.22	14.97	14.58
	2 h/TA	25.72	17.56	16.19
	1 h/37 °C	35.11	16.49	16.18
	2 h/37 °C	20.34	15.93	14.07

la combinación óptima de factores y niveles establecida para este paso del ensayo.

La optimización de los dos primeros pasos del ELISA logró, además del incremento de la relación S/R, la disminución de los tiempos de incubación en 1 h cada uno. Con esto se reduce 2 h el tiempo total que requerirá el ELISA optimizado, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista práctico.

Según Crowther y Smith (1992) uno de los parámetros cruciales en el proceso de optimización de un ELISA es definir la concentración del conjugado enzimático. La cantidad de enzima que se une influye directamente en la señal de absorbancia que se genera. Muy poca enzima origina una débil señal y, por ende, se afecta la relación S/R. Demasiada enzima puede causar un fondo muy alto, dando como resultado también una desfavorable relación S/R. En este trabajo, para determinar el factor de dilución apropiado, el conjugado CBSSlgAH- HRP fue diluido en ocho diluciones seriadas 1:2

usando PBS con 1 % de BSA, por ser el porcentaje con que se logró el mejor resultado en el paso anterior. El factor de dilución óptimo para el conjugado fue 4000 en este ELISA (Tabla 3). Con esta dilución, que fue determinada aplicando todos los factores optimizados en los pasos anteriores del ELISA, se logró una relación S/R 4.67 veces superior a la obtenida con la dilución 1:8000 aplicada en el ELISA preliminar.

Debido a las limitaciones experimentales que puedan presentarse, Altekar *et al.* (2007) han recomendado para los DOEs factoriales completos no evaluar más de seis factores simultáneamente. En este trabajo se evaluó un máximo de cinco factores a la vez, únicamente en la etapa de recubrimiento, sin que ello implicara una alta complejidad experimental. Además, con este tipo de DOE se requieren menos recursos materiales y menos tiempo para la gran cantidad de información que se obtiene. Augustine *et al.* (2015) afirmaron que en un diseño factorial se utilizan muchas observaciones

Tabla 3. Evaluación de los factores de dilución aplicados al conjugado CBSSlgAH- HRP.**Table 3.** Evaluation of the dilution factors applied to the CBSSlgAH-HRP conjugate.

Factor de dilución	A 492 nm del blanco	A 492 nm de la mezcla de leche materna	Señal/ Ruido
1000	0.070	1.580	22.56
2000	0.054	1.515	28.05
4000	0.048	1.750	36.45
8000	0.063	1.227	19.47
16000	0.046	1.000	21.74
32000	0.043	0.621	14.44
64000	0.042	0.382	9.10
128000	0.045	0.206	4.57

A492nm: Absorbancia medida a 492 nm

Los valores de la segunda y tercera columnas representan la media de los valores de absorbancia de tres repeticiones en cada dilución del conjugado. El coeficiente de variación estuvo en el rango entre 0,23 % y 2,96 %. La relación señal/ruido es el cociente entre la A 492 nm de la mezcla de leche materna, corregida con el blanco, y la A 492 nm del blanco.

para estimar el efecto de cada factor de forma más precisa y cada interacción se evalúa de manera sistemática. Cuando no se utiliza el DOE factorial completo se puede presentar una secuencia dispersa de éxito y error en los experimentos, lo que no hace confiables los resultados. Por esta razón consideramos que la optimización del ELISA mediante este diseño experimental ha asegurado la identificación de la mejor combinación de factores y niveles en cada paso del ensayo, y que es acertada la estrategia de incorporarlos sucesivamente al ELISA mientras transcurre el proceso de optimización (Hernández *et al.*, 2023). Además, coincidimos con estos autores en que este tipo de diseño experimental es aplicable para optimizar varios tipos de ELISA: en ese trabajo, los autores lograron aumentar la sensibilidad analítica de un ELISA sándwich cuantitativo; y en el nuestro, que ha trabajado la optimización de un ELISA indirecto, se ha incrementado 4.67 veces la relación S/R respecto al ELISA preliminar no optimizado.

Dado que este ELISA se aplicará para verificar la presencia de anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 generados por la vacuna Abdala en la leche materna, el ensayo optimizado garantizará la detección en aquellas muestras con bajo contenido de anticuerpos, que probablemente tuvieran una señal de A 492 nm cercana al blanco del ensayo si se aplicara el protocolo no optimizado. La presencia de estos anticuerpos en la leche materna será el punto de partida para realizar otro tipo de ensayos, como los que evalúan la actividad neutralizante o la respuesta a la RBD de la variante Ómicron del SARS-CoV-2, considerando que más del 98 % de las secuencias genéticas públicamente disponibles desde febrero de 2022 corresponden a virus Ómicron, y estos constituyen el fondo genético a partir del cual es más probable que surjan nuevas variantes del SARS-CoV-2 (OMS, 2023).

CONCLUSIONES

La práctica de un DOE factorial completo para optimizar un ELISA indirecto, y la aplicación de las condiciones óptimas definidas en una etapa para la optimización de la siguiente, es una estrategia efectiva para lograr un incremento de la relación S/R del ensayo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en el trabajo informado en este documento.

REFERENCIAS

- Ahmed, R.K., Saad, E.M., Fahmy, H.M. y El Nashar, R. M. 2022. Multivariate experimental design: towards more reliable electrochemical detection. *Current Opinion in Electrochemistry*. 31: 100880.
- Altekar, M., Homon, C.A., Kashem, M.A., Mason, S.W., Nelson, R.M., Patnaude, L.A., Yingling, J. y Taylor, P. B. 2007. Assay optimization: a statistical design of experiments approach. *Clinics in Laboratory Medicine*. 27(1): 139-154.
- Arias-Nava, E.H., Ríos-Lira, A.J., Vázquez-López, J.A. y Pérez-González, R. 2015. Estudio comparativo entre los enfoques de diseño experimental robusto de Taguchi y tradicional en presencia de interacciones de control por control. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 16(1): 131-142.
- Ashmawy, R., Hamdy, N., Elhadi, Y., Alqutub, S., Esmail, O., Abdou, M., Reyad, O., El-Ganainy, S., Gad, B., Nour El-Deen, A., Kamal, A., ElSaieh, H., Elrewiny, E., Shaaban, R. y Ghazy, R. 2022. A Meta-Analysis on the Safety and Immunogenicity of COVID-19 Vaccines. *Journal of Primary Care & Community Health*. 13:21501319221089255.
- Augustine, S.A., Simmons, K.J., Eason, T.N., Griffin, S.M., Curioso, C.L., Wymer, L.J., Shay Fout, G., Grimm, A.C., Oshima, K.H. y Dufour, A. 2015. Statistical approaches to developing a multiplex immunoassay for determining human exposure to environmental pathogens. *Journal of Immunological Methods*. 425: 1-9.

- Ben-Shachar, M.S., Lüdtke, D. y Makowski, D. 2020. Effect size: Estimation of effect size indices and standardized parameters. *Journal of Open Source Software*. 5(56): 2815.
- Cohen, J. 1988. The concepts of power analysis. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2: 1-17.
- Crowther, J.R. y Smith, H. 1992. *ELISA Manual* U.K. p.2-21.
- Hernández, C.A., Pérez-Bernal, M., Abreu, D., Valdivia, O., Delgado, M., Dorta, D., Domínguez, A.G., Pérez, E.R. y Sánchez-Ríos, J.M. 2023. Step-by-step full factorial design to optimize a quantitative sandwich ELISA. *Analytical Biochemistry*. 674: 115195.
- Kechagias, J.D., Aslani, K.E., Fountas, N.A., Vaxevanidis, N.M. y Manolagos, D.E. 2020. A comparative investigation of Taguchi and full factorial design for machinability prediction in turning of a titanium alloy. *Measurement*. 151: 107213.
- Limonta-Fernández, M., Chinea-Santiago, G., Martín-Dunn, A.M., Gonzalez-Roche, D., Bequet-Romero, M., Márquez-Perera, G., González-Moya, I., Canaan-Haden-Ayala, C., Cabrales-Rico, A., Espinosa-Rodríguez, L.A., Ramos-Gómez, Y., Andujar-Martínez, I., González-López, L.J., de la Iglesia, M.P., Zamora-Sanchez, J., Cruz-Sui, O., Lemos-Pérez, G., Cabrera-Herrera, G., Valdés-Hernández, J., Martínez-Díaz, E., Pimentel-Vázquez, E., Ayala-Avila, M., y Guillén-Nieto, G. 2022. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *Nature Biotechnology*. 72:11-21.
- Minic, R. y Zivkovic, I. 2020. Optimization, validation and standardization of ELISA. *Norovirus*. 9-28.
- OMS. 2023. Declaración sobre la actualización de las definiciones de trabajo y del sistema de seguimiento de las variantes preocupantes y las variantes de interés del SARS-CoV-2- 16 de marzo de 2023. [Consultado Junio-5-2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest>
- Papaneophytou, C. 2019. Design of experiments as a tool for optimization in recombinant protein biotechnology: from constructs to crystals. *Molecular Biotechnology*. 61(12): 873-891.
- Peng, P., Liu, C., Li, Z., Xue, Z., Mao, P., Hu, J., Xu, F., Yao, C. y You, M. 2022. Emerging ELISA derived technologies for *in vitro* diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 116605.
- Ramírez-Reveco, A., Velásquez, G., Aros, C., Navarrete, G., Villarroel-Espíndola, F., Navarrete, M., Fica, A., Plaza, A., Castro, N., Verdugo, C., Acosta-Jamett, G. y Verdugo, C. 2023. Performance estimation of two in-house ELISA assays for COVID-19 surveillance through the combined detection of anti-SARS-CoV-2 IgA, IgM, and IgG immunoglobulin isotypes. *PLoS ONE*. 18(2): e0270388.
- Ray, C.A., Patel, V., Shih, J., Macaraeg, C., Wu, Y., Thway, M., Lee, J.W. y DeSilva, B. 2009. Application of multi-factorial design of experiments to successfully optimize immunoassays for robust measurements of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49(2): 311-318.
- Rodríguez, M.C., Ceaglio, N., Gugliotta, A., Villaraza, J., Garay, E., Fuselli, A., Gastaldi, V., Tardivo, M.B., Antuña, S., Fontana, D. y Prieto, C. 2022. Design and optimization of an IgG human ELISA assay reactive to recombinant RBD SARSCoV-2 protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106(23): 7933-7948.
- Tsoi, J., Patel, V. y Shih, J. 2014. A practical approach to automate randomized design of experiments for ligand-binding assays. *Bioanalysis*. 6(5): 705-713.

Bacterial resistance status at a level 2 hospital in Northwest Mexico in 2016

Estatus de la resistencia bacteriana en un hospital de nivel 2 en el noroeste de México en 2016

Ildefonso Guerrero-Encinas¹, Javier N. González-González¹, Manuel E. Reyna-Murrieta², Enrique Bolado-Martínez², Marco A. López-Mata³, Gloria G. Morales-Figueroa¹, Cecilia Padilla-Ibarra⁴, Luis Quihui-Cota^{1*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC). Departamento de Nutrición Pública y Salud, Sonora, Hermosillo, México.

² Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, México.

³ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México.

⁴ Laboratorio clínico del Hospital General del Estado, Sonora, Hermosillo, México.

ABSTRACT

Bacterial infections can be serious and require antibiotic treatment. However, the overuse of antibiotics has led to the development of antibacterial resistance, which can make infections more dangerous. This is a serious problem in Mexico, where published research on antibiotic resistance is limited. This study aimed to estimate the prevalence of antibiotic resistance in bacterial infections at the Hospital General del Estado in Hermosillo (HGE), Mexico so that it can be compared with future information and look for strategies to mitigate this problem. Information was collected from logs registered at the hospital microbiology area in 2016, on bacterial cultures with antibiograms from 2,205 biological samples. These data were obtained from the VITEK® system, which provided information on the bacteria spp., their antibiotic resistance, and the type of antibiotics to which were resistant. *Escherichia coli* (28.8%), *Staphylococcus aureus* (11.5%), and *Pseudomonas aeruginosa* (9.8%) were the most isolated bacteria. The highest prevalence of resistance was found against beta-lactam antibiotics. This study revealed that antibiotic resistance is a serious problem at the HGE. These findings highlight the need for further research on antibiotic resistance in Mexico to design national prevention strategies.

Keywords: Bacterial resistance, Antibiotics, Bacterial infections, Northwest Mexico

RESUMEN

Cuando las infecciones bacterianas son serias requieren antibióticos como tratamiento de elección. Sin embargo, su uso excesivo ha conducido al desarrollo de bacterias resistentes, haciéndolas más peligrosas. Este es un serio problema de salud en México, donde la publicación de investigación sobre este tópico es aún limitada. Este estudio tuvo como objetivo estimar la prevalencia de resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas en el Hospital General del Estado en Hermosillo (HGE), México, y compararse con información futura, estimar tendencias, y buscar estrategias contra este

problema. Se recopiló información de 2,205 registros microbiológicos sobre cultivos bacterianos con antibiogramas de muestras de pacientes en 2016. Estos datos se obtuvieron a través del sistema VITEK®, que proporcionó información sobre las especies bacterianas, y su resistencia contra y tipo de antibióticos. Las bacterias más aisladas fueron *Escherichia coli* (28.8%), *Staphylococcus aureus* (11.5%) y *Pseudomonas aeruginosa* (9.8%). Las prevalencias más altas de resistencia se encontraron contra antibióticos beta-lactámicos. La resistencia a los antibióticos es un problema grave de salud en el HGE. Esto resalta la necesidad de investigar más sobre la resistencia a los antibióticos en México, para que las autoridades consideren tal información en el diseño de estrategias preventivas.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, Antibióticos, Infecciones bacterianas, Noroeste de México

INTRODUCTION

Bacterial infections can compromise the host's health status, making it necessary to use treatments that help and promote the elimination of the pathogen for the proper recovery of the patient. It is important to mention that the severity of bacterial infections depends on the condition and status of the host, such as age, sex, nutritional status, and the presence of other concomitant pathologies (Humphries *et al.*, 2021). Usually, the first-choice treatment against bacterial infections is antibiotics. However, over time its inappropriate use has stimulated bacteria to develop resistance against these drugs (Jernigan *et al.*, 2020)

In addition, it has been estimated that for every 100 thousand habitants, infections with antibiotic-resistant bacteria results in 57.9 deaths in Latin America and the Caribbean, 42.0 deaths in North Africa and the Middle East, and 67.7 deaths in Central Europe, Eastern Europe, and Central Asia (Murray *et al.*, 2022). This problem is associated with both Gram-positive and Gram-negative bacteria; however, the latter is the most common (Gupta and Datta, 2019). In this way, it has been reported that *Escherichia coli*, *Acineto-*

*Correspondence author: Luis Quihui Cota
e-mail: lquihui@ciad.mx

Received: May 25, 2023

Accepted: August 22, 2023

Published: September 21, 2023

bacter baumannii, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*, are the main causes of nosocomial infections resistant to antibiotic treatment (Rello *et al.*, 2019).

This bacterial resistance may be due to various defense response mechanisms of the microorganism, which allow them to inactivate drugs through their enzymatic system. It can also occur through the expulsion of the drug by flow pumps or, through the modification of its cell wall, reducing its permeability and avoiding the internalization of antibiotics (Breijyeh *et al.*, 2020). In this regard, the increase in infections caused by resistant bacteria implies greater complications in the health of patients, as well as an increase in medical expenses due to the prolongation of convalescence time (Banin *et al.*, 2017). For this reason, it is important to have case records of bacterial infections and identify which of them showed unusual responses to antibiotic treatment, to understand this problem and propose solutions that allow us to deal with future events. Antimicrobial resistance in countries like Mexico is difficult to address because of the absence of a regulatory body to effectively control the use and sale of antimicrobials, the prescription and self-medication, and the lack of information available on antimicrobial resistance (INSP, 2022). Similarly, more research is required in health centers located particularly in northwest Mexico. In this context, this work aimed to collect records of bacterial infections and determine the prevalence of bacterial resistance to antibiotics in patients treated at the Hospital General del Estado (HGE) in Hermosillo, Sonora from January to August 2016, to showcasing the updated status and, to encourage future investigations for comparative analysis. This study intends to furnish pertinent evidence to prompt the relevant authorities to implement appropriate measures for controlling this issue.

MATERIAL AND METHODS

To carry out the study, information was collected from the logs of the microbiology area of the HGE from 2,205 registered biological samples, of which, in some cases, more than one bacterium was isolated, keeping data on bacterial cultures with antibiograms of patients older than 18 years, considering the age-group ranges as follows: 18 - 28 (n = 309), 29 - 39 (n = 323), 40 - 50 (n = 475), 51 - 61 (n = 464), 62 - 72 (n = 373), and > 73 (n = 261) years old. The samples consisted of blood, pharyngeal exudate, expectoration, bronchial secretion, catheter tip, tissue, stools, urine, wounds, and their secretions (samples collected with swabs, and transported in microbiological medium Stuart). These data were obtained from the VITEK® system (Biomeireux), which provided information about the identity of the bacteria, their resistance to antibiotics, type of the antibiotic to which were resistant as well as the capacity to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBL).

Information was classified based on the hospital service area from which the samples came; external consultation (EC), emergency room (ER), infectious diseases (IFN), orthopedics (ORT), surgery for men (SURM), medicine for men (MEDM), intensive therapy unit (ITU), medicine for women

(MEDW), intensive care unit (ICU), women's surgery (SURW) and hemodialysis (HEM). All the information was collected from January to August 2016. The present study was a cross-sectional, and retrospective aimed to determine the bacterial prevalence by species and hospital area, as well as the percentage of bacterial resistance (% R) to each and type of antibiotic by species, age group, sex, and hospital area. This study was evaluated and approved by the ethics committee of the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora.

A 2-sided Chi-square test was performed on the data obtained to establish differences in antibiotic resistance between females and males. All the data were analyzed with the STATA package version 2012 at a significance level of $p \leq 0.05$.

RESULTS

Table 1 shows the bacterial species isolated during the study based on rank of prevalence: *E. coli* (28.8 %), *Staphylococcus aureus* (11.5 %), *P. aeruginosa* (9.8 %), *Klebsiella pneumoniae* spp. (7.5 %) and *Staphylococcus hominis* (4.1 %). The hospital area with the highest general prevalence of bacterial species (Table 2) was EC (23.0 %), followed by ER (15.0 %), INF (11.0 %), and ORT (11.0 %). The species with the highest prevalence in EC (48.8 %), ER (38.4 %), SURM (33.0 %), and MEDW (28.6 %) was *E. coli*.

In addition, Table 3 shows data on bacterial resistance to antibiotics. For Gram-negative bacteria a higher resistance to ampicillin (AMP) (85.2 %), ampicillin/sulbactam (SAM) (68.9 %), and cefazolin (CFZ) (61.0 %) was registered. On the other hand, for Gram-positive bacteria a higher resistance to benzylpenicillin (BPE) (87.6 %), AMP (60.7 %), and erythromycin (ERI) (60.4 %) was also estimated. Furthermore, 37 % of ESBL were positive out of 818 records analyzed.

Table 4 shows the prevalence of bacterial species resistance to commonly used antibiotics by service area out of 1,781 records. As before, for BPE the highest prevalence of resistance in the ER (19.0 %) was observed, followed by IFN (14.7 %), ICU (8.1 %), ITU (7.6 %), and HEM (3.9 %). For AMP, a higher resistance was observed in EC (29.8 %) and SURM (9.7 %); and finally, for cefazolin (CFZ) in ORT (17.3 %). In addition, the highest prevalence of ESBL (15.1 %) was observed in EC.

Regarding the information by age groups (Table 5), *E. coli* showed the highest prevalence in patients of all ages, followed by *S. aureus* (10.5 - 13.0 %) and *P. aeruginosa* (7.1 - 13.0 %). However, patients in the age-range 51- 61 years (n = 148) (data not shown) showed the highest prevalence (31.2 %). BPE was the antibiotic to which a high prevalence of resistance was found in patients between 18 and 61 years old (from 84.1 to 91.7 %). On the other hand, the resistance to AMP was the highest (85.3 %) in patients aged 62 and 72 years. In addition, the highest resistance to ESBL was found in patients between 40 - 50 and 62 - 72 years old (39.8 and 39.5 % respectively).

On the other hand, a higher prevalence of infections was observed in males (n = 1,213) than in females (n = 802), being *E. coli* the most frequent in both groups (data not shown).

Table 1. Prevalence of bacterial species isolated and identified from 2,205 biological samples at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, during the January to August 2016 period.**Tabla 1.** Prevalencia de especies bacterianas aisladas e identificadas de 2,205 muestras biológicas en el Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, durante el período de enero a agosto de 2016.

Gram positive bacteria		Gram negative bacteria	
Bacterial species	Prevalence n (%)	Bacteria species	Prevalence n (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	254 (11.5 %)	<i>Escherichia coli</i>	634 (28.8 %)
<i>Staphylococcus hominis</i> spp. <i>hominis</i>	90 (4.1 %)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	215 (9.8 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	84 (3.8 %)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	166 (7.5 %)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	73 (3.3 %)	<i>Enterobacter cloacae</i> spp. <i>cloacae</i>	83 (3.8 %)
<i>Streptococcus mitis</i>	28 (1.3 %)	<i>Proteus mirabilis</i>	77 (3.5 %)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	27 (1.2 %)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	64 (2.9 %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	21 (0.95 %)	<i>Citrobacter freundii</i>	30 (1.4 %)
<i>Staphylococcus lentus</i>	15 (0.7 %)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	26 (1.2 %)
<i>Enterococcus faecium</i>	13 (0.6 %)	<i>Morganella morganii</i> spp. <i>morganii</i>	21 (0.9 %)
<i>Kocuria kristinae</i>	13 (0.6 %)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	18 (0.8 %)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10 (0.5 %)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	12 (0.5 %)
<i>Staphylococcus warneri</i>	10 (0.5 %)	<i>Serratia marcescens</i>	12 (0.5 %)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	7 (0.31 %)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	10 (0.5 %)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	6 (0.3 %)	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	8 (0.4 %)
<i>Kocuria rosea</i>	6 (0.3 %)	<i>Providencia rettgeri</i>	7 (0.3 %)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	5 (0.2 %)	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	7 (0.3 %)
<i>Aerococcus viridans</i>	4 (0.2 %)	<i>Pseudomonas luteola</i>	6 (0.3 %)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4 (0.2 %)	<i>Enterobacter cloacae</i> spp. <i>dissolvens</i>	5 (0.2 %)
<i>Escherichia coli</i>	634 (28.8 %)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	5 (0.2 %)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	215 (9.8 %)	<i>Providencia stuartii</i>	4 (0.2 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	166 (7.5 %)	<i>Burkholderia cepacia</i>	4 (0.2 %)
		<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	4 (0.2 %)
		<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	3 (0.1 %)

n = number of bacterial isolates.

Lastly, the prevalence of resistance by sex is shown in Table 6. High resistance to BPE, AMP, and SAM was found (88.8, 81.4, and 67.3 %, respectively) in isolates from female patients (n = 865). Similarly, in male patients (n = 1,340), the highest resistance was also observed to BPE, AMP, and SAM (86.9, 84.9, and 70.2 %, respectively). Thus, the antibiotics to which a significant difference in bacterial resistance was found between sexes were OXA, CFZ, cefoxitin (CTX), ceftriaxone (CRO), aztreonam (ATM), piperacillin/tazobactam (TZP), ciprofloxacin (CIP), amikacin (AMK), nitrofurantoin (NIT), tigecycline (TGY), and linezolid (LZ). On the other hand, a higher percentage of bacterial resistance was found for each one of the mentioned antibiotics in women than in males. Finally, the prevalence of ESBL in females and males was 33.1 and 41.2 % respectively.

DISCUSSION

Currently, reports are indicating that *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, are the main bacteria causing deaths worldwide (Murray *et al.*, 2022), and they were predominant in this study. On the other hand, the Mexican Ministry of Health in 2011 analyzed a total of 48,377 biological samples, and reported *E. coli* with 16.9 % (8,192 samples) as the most isolated bacteria species, followed by the coagulase-negative *Staphylococcus* (*S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, and *S. haemolyticus*) with 14.0 % (6,771 samples), and *P. aeruginosa* with 10.9 % (5,275 samples) (Arias-Flores *et al.*, 2016) followed by the group of Coagulase-negative Staphylococci with 6771 cultures (14 %, which agreed with this study. It has been reported that in countries such as Ethiopia, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*, are the

Table 2. Prevalence of bacterial species isolated and identified from 2,113 biological samples by care services at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, from January to August 2016.**Tabla 2.** Prevalencia de especies bacterianas aisladas e identificadas a partir de 2,113 muestras biológicas por servicios de atención del Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, durante el período de enero a agosto de 2016.

Bacterial species	EC (%)	ER (%)	INF (%)	ORT (%)	SURM (%)	MEDM (%)	ITU (%)	MEDW (%)	ICU (%)	SURW (%)	HEM (%)
<i>E. coli</i>	48.8	38.4	12.8	19.3	23.6	15.8	13.3	28.6	7.5	33.0	11.3
<i>S. aureus</i>	4.3	15.0	9.0	22.3	13.3	8.9	15.6	7.6	15.0	7.4	15.9
<i>P. aeruginosa</i>	7.2	4.2	8.5	12.0	12.0	10.8	12.0	5.0	19.6	18.0	2.3
<i>K. pneumoniae</i>	8.4	6.6	8.1	4.3	8.7	7.6	12.0	5.9	3.7	9.6	2.3
<i>S. haemolyticus</i>	2.0	2.7	12.0	1.7	5.6	12.0	6.3	13.4	6.5	2.1	4.5
<i>S. homini</i>	1.6	4.8	6.4	4.3	2.1	7.0	3.1	5.9	7.5	1.1	9.1
<i>E. faecalis</i>	3.7	5.4	3.0	3.4	4.6	3.8	3.9	3.4	0.0	3.2	0.0
<i>E. cloacae</i> spp. <i>cloacae</i>	2.7	3.0	5.6	8.2	1.5	3.8	2.3	3.4	1.9	3.2	18.2
<i>P. mirabilis</i>	3.3	3.9	1.3	3.9	7.2	2.5	4.7	2.5	0.9	3.2	2.3
<i>S. epidermidis</i>	1.4	2.1	3.0	2.6	3.6	2.5	5.5	4.2	0.0	4.3	0.0
<i>A. baumannii</i>	1.2	0.3	5.1	3.0	3.1	6.3	4.7	2.5	9.3	2.1	0.0
<i>C. freundii</i>	1.0	0.6	3.8	1.3	1.5	1.9	0.8	1.7	0.0	0.0	0.0
<i>S. mitis</i>	1.2	1.2	3.4	0.9	0.5	1.3	0.8	1.7	0.9	1.1	2.3
<i>S. parasanguinis</i>	2.3	0.3	3.0	0.4	0.0	1.3	0.8	2.5	0.0	0.0	2.3
<i>S. maltophilia</i>	0.2	1.2	4.3	0.4	0.5	1.3	0.8	0.0	3.7	1.1	0.0
<i>M. morgani</i>	1.8	0.9	0.4	0.4	1.0	2.5	0.0	0.8	0.0	0.0	2.3
<i>S. pneumoniae</i>	1.2	0.9	0.9	0.0	0.0	1.3	2.3	0.8	3.7	0.0	0.0
<i>K. oxytoca</i>	0.4	1.2	0.4	0.0	1.0	1.3	1.6	0.0	0.0	3.2	2.3
<i>S. lentus</i>	1.0	0.6	0.4	1.7	0.0	1.3	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
<i>E. faecium</i>	0.0	0.9	0.9	0.0	1.0	1.3	0.0	0.0	0.9	2.1	0.0
<i>K. kristinae</i>	0.2	0.3	0.4	0.4	0.5	0.6	0.8	2.5	1.9	1.1	0.0
<i>K. aerogenes</i>	0.2	0.0	0.4	0.0	1.5	1.3	1.6	1.7	1.9	0.0	0.0
<i>S. marcescens</i>	1.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0
<i>E. cloacae</i> spp. <i>complex</i>	0.4	0.9	0.4	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. intermedius</i>	0.8	0.0	0.9	0.4	0.0	0.6	1.6	0.8	0.0	0.0	0.0
<i>S. warneri</i>	0.0	0.0	1.3	2.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
<i>A. baumannii</i> <i>complex</i>	0.0	0.0	1.3	0.9	0.0	0.0	0.8	1.7	0.0	0.0	0.0
<i>P. rettgeri</i>	0.4	0.3	0.0	0.0	0.5	0.6	0.8	0.8	0.0	0.0	0.0
<i>R. ornithinolytica</i>	0.6	0.0	0.4	0.9	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. sanguinis</i>	0.6	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
TOTAL (n)	512	333	237	233	201	158	128	119	107	88	44
	23 %	15 %	11 %	11 %	9 %	7 %	6 %	5 %	5 %	4 %	2 %

EC= external consultation; ER= emergency room; INF= infectious diseases; ORT= orthopedics; SURM= surgery for man; MEDM= medicine for man; ITU= intensive therapy unit; MEDW= medicine for women; ICU= intensive care unit; SURW= surgery for women; HEM= hemodialysis.

Table 3. Prevalence of resistance (% R) of the bacterial species isolated and identified from 2,205 biological samples against the antibiotics used at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, from January to August 2016.**Tabla 3.** Prevalencia de resistencia (% R) de las especies bacterianas aisladas e identificadas de 2,205 muestras biológicas frente a los antibióticos utilizados en el Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, de enero a agosto de 2016.

Drugs		Gram negative bacteria	Gram positive bacteria
Drug group	Antibiotic	% R	% R
I Beta-lactams			
1. Penicillins	AMP	85.23	60.7
	BPE	ND	87.61
	OXA	ND	54.51
2. Cephalosporins	CFZ	61.05	ND
	FEP	37.37	ND
	CTX	ND	42.18
	CRO	48.02	ND
3. Monobactam	ATM	38.91	ND
4. Beta-lactam/beta-lactamase inhibitors	SAM	68.94	ND
	TZP	30.75	ND
5. Carbapenems	ETP	2.47	ND
	MEM	11.06	ND
II Quinolones	CIP	47.02	45.93
	LVX	ND	42.92
	MFX	ND	31.26
III Aminoglycosides	AMK	8.9	ND
	STR	ND	34.31
	GEN	29.79	21.12
	TOB	33.9	ND
IV Sulfonamide/Trimethoprim	SXT	54.46	28.86
	NIT	46.02	4.57
V Macrolides and Lincosamides	CLI	ND	58.7
	ERI	ND	60.47
VI Tetracyclines/Glycylcyclines	TCY	ND	24.26
	TGY	28.33	1.48
VII Oxazolidone and streptogramin	LZ	ND	0.87
	QXD	ND	14.49
VIII Rifamycins	RIF	ND	14.26
IX Glycopeptides	VAN	ND	0.88
ESBL		NEG* 516 (63 %)	POS* 302 (37 %)

*POS= positive y NEG= negative. Ampicillin (AMP); benzylpenicillin (BPE); oxacillin (OXA); cefazolin (CFZ); cefepime (FEP); ceftioxin (CTX); ceftriaxone (CRO); aztreonam (ATM); ampicillin sulbactam (SAM); piperacillin/tazobactam (TZP); ertapenem (ETP); meropenem (MEM); ciprofloxacin (CIP); levofloxacin (LVX); moxifloxacin (MFX); amikacin (AMK); streptomycin (STR); gentamicin (GEN); tobramycin (TOB); trimethoprim+sulfamethoxazole (SXT); nitrofurantoin (NIT); clindamycin (CLI); erythromycin (ERI); tetracycline (TCY); tigecycline (TGY); linezolid (LZ); quinupristin/dalfopristin (QXD); rifampicin (RIF); vancomycin (VAN); ESBL= extended-spectrum beta-lactamases.

Table 4. Prevalence of resistance (% R) of bacterial species isolated and identified from 1,781 biological samples from different care areas at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, during the January to August 2016 period.

Tabla 4. Prevalencia de resistencia (% R) que presentan las especies bacterianas aisladas e identificadas de 1,781 muestras biológicas en las diferentes áreas de atención del Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, durante el período de enero a agosto de 2016.

*TX	ORT	SURM	HEM	INF	ITU	EC	ICU	ER
	% R	% R	% R	% R	% R	% R	% R	% R
AMP	9.0	9.7	0.8	8.9	5.5	29.8	4.0	15.0
BPE	14.5	9.2	3.9	14.7	7.6	10.1	8.1	19.0
OXA	6.5	6.1	2.4	12.8	3.7	5.4	6.1	8.2
CFZ	17.3	9.6	2.5	3.5	4.4	2.0	0.7	0.3
FEP	4.4	3.0	0.2	3.4	2.5	22.3	1.1	4.4
CTX	7.5	6.8	0.9	13.2	4.9	5.3	6.2	9.3
CRO	7.3	5.7	0.3	6.5	3.9	13.4	3.3	6.5
ATM	5.4	3.8	0.3	5.6	2.9	12.0	1.7	6.2
SAM	7.3	7.0	0.7	6.1	3.9	29.6	3.4	11.0
TZP	7.7	3.2	0.5	5.3	4.0	3.2	2.4	3.4
ETP	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2	0.6	0.0	1.1
MEM	1.6	1.5	0.0	0.7	1.2	2.5	1.2	1.2
CIP	6.0	4.6	1.0	6.4	3.0	14.4	2.7	7.6
LVX	5.0	5.3	1.8	9.9	2.8	3.5	4.2	7.4
MFX	4.0	4.6	1.1	6.8	2.2	2.6	2.4	6.2
AMK	4.0	4.6	1.1	6.8	2.2	2.6	2.4	6.2
STR	3.6	2.4	0.0	7.1	1.2	8.3	1.2	9.5
GEN	4.1	2.4	0.4	3.7	1.9	7.2	1.6	4.8
TOB	5.0	2.8	0.4	3.4	2.2	12.8	1.7	5.0
SXT	5.7	5.3	1.0	6.3	3.3	14.3	3.1	7.2
NIT	4.2	4.3	0.2	4.0	2.7	10.1	2.4	4.4
CLI	7.5	7.7	2.4	12.3	5.0	7.0	4.6	10.8
ERI	7.6	7.4	2.2	13.3	4.2	6.8	5.5	11.6
TCY	1.5	3.1	0.9	3.5	2.0	5.4	1.5	5.0
TGY	3.5	2.9	0.2	2.3	1.5	5.1	1.3	2.6
LZ	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2
QXD	1.7	2.4	0.2	1.7	1.1	3.1	0.6	3.7
RIF	1.3	0.6	0.4	6.5	0.9	1.1	1.1	1.7
VAN	0.0	0.2	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.2
ESBL	3.6 %	3.0 %	0.3 %	3.9 %	2.2 %	15.1 %	0.6 %	7.0 %

TX= antibiotic, ampicillin (AMP); benzylpenicillin (BPE); oxacillin (OXA); cefazolin (CFZ); cefepime (FEP); ceftioxin (CTX); ceftriaxone (CRO); aztreonam (ATM); ampicillin sulbactam (SAM); piperacillin/tazobactam (TZP); ertapenem (ETP); meropenem (MEM); ciprofloxacin (CIP); levofloxacin (LVX); moxifloxacin (MFX); amikacin (AMK); streptomycin (STR); gentamicin (GEN); tobramycin (TOB); trimethoprim+sulfamethoxazole (SXT); nitrofurantoin (NIT); clindamycin (CLI); erythromycin (ERI); tetracycline (TCY); tigecycline (TGY); linezolid (LZ); quinupristin/dalfopristin (QXD); rifampicin (RIF); vancomycin (VAN); extended-spectrum beta-lactamases (ESBL); orthopedics (ORT); surgery for man (SURM); hemodialysis (HEM); infectious disease (INF); intensive unit therapy (ITU); external consultation (EC); intensive care unit (ICU); emergency room (ER).

Table 5. Prevalence of resistance (% R) and sensitivity (% S) by age group (years), of bacterial species isolated at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, during the January to August 2016 period, from 2,205 biological samples.

Tabla 5. Prevalencia de resistencia (% R) y sensibilidad (% S) de especies bacterianas aisladas por grupo de edad (años) en el Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, durante el periodo de enero a agosto de 2016, a partir de 2,205 muestras biológicas.

Antibiotic	(18 - 28)	(29 - 39)	(40 - 50)	(51 - 61)	(62 - 72)	(>73)
	% R	% R	% R	% R	% R	% R
AMP	70.6	80.4	83.2	80.0	85.3	78.0
BPE	91.7	84.1	89.9	85.4	85.1	90.3
OXA	49.5	50.0	55.7	52.8	60.5	66.7
CFZ	67.3	62.6	64.6	62.2	57.1	51.6
FEP	30.5	23.7	37.1	34.2	30.6	30.9
CTX	56.1	51.8	60.7	55.6	63.2	66.7
CRO	54.4	42.4	48.6	49.7	44.0	41.7
ATM	39.8	33.8	43.2	41.0	38.1	34.9
SAM	75.7	68.2	66.5	73.6	67.9	60.5
TZP	44.3	17.6	38.2	27.9	24.3	34.0
ETP	1.9	0.8	0.4	2.2	3.5	2.5
MEM	14.6	11.9	13.5	12.1	7.1	7.7
CIP	41.6	35.8	48.6	49.5	50.3	52.8
LVX	39.2	33.3	44.2	43.8	50.0	53.2
MFX	30.0	19.8	31.9	34.3	36.2	40.3
AMK	13.9	6.9	12.3	10.2	4.3	5.5
STR	15.4	16.7	33.3	34.5	42.1	57.1
GEN	23.7	22.0	28.2	27.5	31.0	28.0
TOB	30.4	27.6	30.1	39.7	38.5	31.4
SXT	49.5	38.3	44.4	51.8	48.4	60.6
NIT	33.0	27.9	30.4	32.3	35.3	36.4
CLI	57.9	54.8	59.4	59.1	56.4	67.7
ERI	61.0	54.0	59.4	59.9	64.9	66.1
TCY	11.0	13.5	30.9	30.7	30.9	32.3
TGY	21.4	16.9	20.3	19.9	22.8	19.7
LZ	0.0	0.0	0.0	1.9	1.3	2.1
QXD	13.4	10.3	10.2	18.4	19.1	16.1
RIF	12.3	14.9	9.8	27.9	14.5	14.6
VAN	0.0	0.8	0.0	0.7	3.2	1.6
ESBL						

Ampicillin (AMP); benzylpenicillin (BPE); oxacillin (OXA); cefazolin (CFZ); cefepime (FEP); cefoxitin (CTX); ceftriaxone (CRO); aztreonam (ATM); ampicillin sulbactam (SAM); piperacillin/tazobactam (TZP); ertapenem (ETP); meropenem (MEM); ciprofloxacin (CIP); levofloxacin (LVX); moxifloxacin (MFX); amikacin (AMK); streptomycin (STR); gentamicin (GEN); tobramycin (TOB); trimethoprim+sulfamethoxazole (SXT); nitrofurantoin (NIT); clindamycin (CLI); erythromycin (ERI); tetracycline (TCY); tigecycline (TGY); linezolid (LZ); quinupristin/dalfopristin (QXD); rifampicin (RIF); vancomycin (VAN); ESBL= extended-spectrum beta-lactamases.

Table 6. Prevalence of resistance (% R) of bacterial species isolated and identified from 865 female patients and 1,340 male patients at the Hospital General del Estado in Hermosillo, Sonora, during the January to August 2016 period.

Tabla 6. Prevalencia de resistencia (% R) de especies bacterianas aisladas e identificadas de 865 pacientes del sexo femenino y 1,340 del sexo masculino en el Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, durante el período de enero a agosto de 2016.

Drug group	Antibiotic	Female n (% R)	Male n (% R)	p
I Beta-lactams				
1. Penicillins	AMP	490 (81.4)	632 (84.9)	0.071
	BPE	191 (88.8)	398 (86.9)	0.478
	OXA	107 (61.1)	207 (51.6)	0.034*
2. Cephalosporins	CFZ	318 (53.2)	533 (66.9)	0.001*
	FEP	186 (31.1)	267 (33.5)	0.335
	CTX	11 (63.4)	222 (55.4)	0.001*
3. Monobactam	CRO	257 (43.1)	413 (51.9)	0.001*
	ATM	186 (35.4)	273 (42)	0.021*
4. Beta-lactam/beta-lactamase inhibitors	SAM	378 (67.3)	479 (70.2)	0.259
	TZP	33 (15.7)	105 (32.8)	0.001*
5. Carbapenems	ETP	14 (2.8)	13 (2.2)	0.497
	MEM	50 (8.8)	95 (12.7)	0.225
II Quinolones	CIP	338 (47.7)	579 (46.1)	0.045*
	LVX	101 (47)	190 (41)	0.146
	MFX	74 (34.3)	138 (29.8)	0.243
III Aminoglycosides	AMK	34 (5.9)	85 (11.3)	0.001*
	STR	137 (33.8)	22 (35.5)	0.798
	GEN	227 (27.9)	330 (26.2)	0.203
	TOB	197 (32.9)	279 (34.2)	0.402
IV Sulfonamide/Trimethoprim	SXT	385 (49.6)	554 (45.5)	0.071
	NIT	236 (29)	436 (34.6)	0.007*
V Macrolides and Lincosamides	CLI	129 (60)	269 (58.1)	0.640
	ERI	137 (63.7)	273 (59)	0.238
VI Tetracyclines/Glycylcyclines	TCY	51 (23.8)	114 (24.6)	0.824
	TGY	127 (15.7)	274 (21.8)	0.001*
VII Oxazolidone and streptogramin	LZ	2 (1.1)	3 (0.8)	0.001*
	QXD	33 (15.3)	65 (14.1)	0.667
VIII Rifamycins	RIF	28 (16)	54 (13.5)	0.430

*Chi-square, significance at level of $p \leq 0.05$. Ampicillin (AMP); benzylpenicillin (BPE); oxacillin (OXA); cefazolin (CFZ); cefepime (FEP); ceftioxin (CTX); ceftriaxone (CRO); aztreonam (ATM); ampicillin sulbactam (SAM); piperacillin/tazobactam (TZP); ertapenem (ETP); meropenem (MEM); ciprofloxacin (CIP); levofloxacin (LVX); moxifloxacin (MFX); amikacin (AMK); streptomycin (STR); gentamicin (GEN); tobramycin (TOB); trimethoprim+sulfamethoxazole (SXT); nitrofurantoin (NIT); clindamycin (CLI); erythromycin (ERI); tetracycline (TCY); tigecycline (TGY); linezolid (LZ); quinupristin/dalfopristin (QXD); rifampicin (RIF); vancomycin (VAN); ESBL= extended-spectrum beta-lactamases.

most common antibiotic resistant-bacteria, suggesting that those bacterial species are the most serious health problem worldwide (Berhe *et al.*, 2021). It is recognized that ESBL-producing *E. coli* infections are not necessarily considered as an intra-hospital infection since these have already been reported in outpatients. This may explain the high prevalence of infections registered in EC and ER, suggesting that this type of pathogens may be spreading outside hospitals (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004).

The findings in this study revealed a high prevalence of bacteria resistant to antibiotics belonging to the beta-lactams group (penicillins and cephalosporins), and to ERI belonging to the macrolides and lincosamides group. In another study carried out in 2017 in 47 health centers and 20 regions of Mexico, a high bacterial resistance to third and fourth-generation cephalosporins (> 50.0 %) and trimethoprim-sulfamethoxazole (> 60.0 %) was reported (Garza-González *et al.*, 2019). In addition, such data is like that of this study (47.1 %). β -lactam antibiotics are the choice treatment and they are effective against some pathogenic bacteria (Russ *et al.*, 2020). Likewise, some bacteria can produce ESBL, enzymes that confer resistance against β -lactam antibiotics. These enzymes hydrolyze the β -lactam ring of the antibiotic limiting its therapeutic activity (Hermann *et al.*, 2005). In agreement to this, an increase in the appearance of bacterial resistant to ceftriaxone, belonging to the group of cephalosporins, has been observed, mainly by *E. coli* and *K. pneumoniae* (Rolain *et al.*, 2016). In this regard, these two bacteria are commonly associated with the production of ESBL. *E. coli* and *K. pneumoniae* are frequently found in the human intestine and they spread through feces which implies a public health problem (Cocker *et al.*, 2022).

ESBL-producing microorganisms are frequently multi-resistant. So, the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program has revealed a prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* of 45.0 and 8.5 % in Latin America; 7.6 and 3.3 % in the United States; and 22.6 and 5.3 % in Europe. These bacteria cause infections in hospitalized patients with malnutrition and comorbidities, and carbapenems may be the first choice of treatment because they are resistant to hydrolysis by ESBL-producing bacteria (Navarro-Navarro *et al.*, 2011).

A high prevalence of resistance was observed in the ER, IFN and ICU services, with BPE as the antibiotic to which the highest resistance was recorded. It is noteworthy to mention that in the ICU, usually critical state patients with compromised immune systems are accommodated (López-Pueyo *et al.*, 2011). A study conducted in 2012 at the Daniel Alcides National Hospital in Peru analyzed 3,149 samples from patients with intra-hospital infections and reported that 29.4 % were ESBL-producing bacteria, and the area with the highest prevalence was EC with 37.42 % (Tejada Llacsá *et al.*, 2015). On the other hand, a high prevalence of ESBL in people being attended at external consultation, reinforces the idea that this problem goes beyond intra-hospital infections. It has been reported that in the University of Lagos Medical Centre

(n = 350), ESBL-producing bacteria (mainly *E. coli* and *K. pneumoniae*) resistant to AMP were isolated from stool and urine samples of apparently healthy outpatient (Deji-Agboola *et al.*, 2020). It is evidenced that antibiotic-resistance genes are spreading outside hospitals and many of these bacteria may be part of the human microbiota emphasizing the seriousness of this problem.

On another hand, the most prevalent bacterium in any age group was *E. coli*, showing the highest prevalence in patients older than 40 years. Previous reports has stated that patients between 60 and 70 years old (Xiamen, China, 2015) suffer infections associated with antibiotic-resistant *A. baumannii* (Huang *et al.*, 2018). It has suggested that adult patients might be more susceptible to some bacterial infections than younger patients. The literature has reported that older people may be more susceptible to different pathologies, due to natural physiological changes that may influence the immune system status (Sadighi Akha, 2018).

In this study, a trend of higher prevalence of antibiotic-resistant bacteria was observed with age, which may be an important criterion regarding the sensitivity of some antibiotics. It has been proposed that resistance is more frequent in people over 60 years old in comparison to younger ones, probably associated with the frequent use of catheters and a high occurrence of chronic diseases (Zúniga-Moya *et al.*, 2016). Furthermore, a study of 3,149 participants showed that the age group with the highest prevalence of ESBL-producing bacteria was over 65 years old (26.6 %) (Tejada Llacsá *et al.*, 2015). However, the high prevalence of resistance to the penicillin group (> 80 %) isolated from all age groups, has suggested that penicillins are no longer effective (Marín and Gudíol, 2003).

On the other hand, a higher number of infections were observed in men as compared to women. It has been reported that, in mammals, males can become more susceptible to infections than females, an event probably associated with variations in the immune response dependent by sex (Klein and Flanagan, 2016). Cases of infections by pathogenic bacteria are more frequent in male than in female. It has been thought that women may have a better immune defense due to an increased response by some cells of the innate immune system (macrophages and dendritic cells) reducing the risk of infection (vom Steeg and Klein, 2016).

On the other hand, sex hormones levels may also play an important role in the function of some immune cells (lymphocytes, macrophages, and dendritic cells). The interaction of sex hormones with some receptors can directly influence signaling processes associated with the production of cytokines, which can vary depending on sex (Kadel and Kovats, 2018). However, this remains unclear. It has also been observed that the presence of ESBL is dependent on age and sex, and is more commonly observed in elderly people and males, so actions should be proposed to attend to the most vulnerable groups (Martin *et al.*, 2016).

Currently, the bacterial resistance to antibiotics shows a high variability worldwide. Apparently, the developed coun-

tries have shown a lower incidence of this health problem than in some African and Latin-American countries (Health Policy Watch, 2022). For example, in Mexico, a few studies carried out at different hospitals reported a high prevalence of bacterial resistance and it remains unchanged with time, while this problem tends to increase in other countries. This has suggested that strategies to curb this situation in some countries have been somehow established without being monitored, while in others they are urgently required (Patel *et al.*, 2023).

Additionally, it is important to consider that the severity of this problem may be greater, because since the 2019 to March 2020 period of the SARS-COV-2 pandemic, an increase of 11.2 % in the consumption of antimicrobials was registered worldwide (Khouja *et al.*, 2022). In Mexico, an increase was also recorded in bacterial resistance during this pandemic, with predominant cases of *S. aureus* resistant to OXA, and *K. pneumoniae* resistant to carbapenem (data from 46 centers in Mexico) (López-Jácome *et al.*, 2022). In addition, other studies carried out in Northwestern Mexico have suggested that a third of the population resorted self-medication due to the pandemic, however, drugs used were not identified (Torres Soto *et al.*, 2022). This situation can change the current context of resistance in this region, so new studies are required to follow up on this problem in the city of Hermosillo, to take actions in real time to prevent a more serious stage.

CONCLUSIONS

Updated information about the prevalence of bacterial species that cause infections in patients of different hospital areas, will allow for the design of hospital prevention and control strategies for *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* spp, *S. haemolyticus*, and *S. hominis* infections, which are commonly isolated from biological samples collected from HGE patients during the study period. On the other hand, the use of antibiotics in hospital patients should be monitored based on their route of administration, dose, treatment extension, and interactions with other medications. Also, special attention should be paid to the management of antibiotics belonging to the β -lactams, as they are the antibiotics against which the highest resistance was found. In addition, it is advisable to monitor the patient effectively complies with his treatment period, to prevent the increase of bacterial resistance and the appearance of multi-resistant strains as evidenced by this work.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Hospital General del Estado of Hermosillo, the Universidad de Sonora, the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) and the CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES, CIENCIA Y TECNOLOGÍA of Mexico (CONAHCyT) for making this work possible.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., and Grajales-Muñiz, C. 2016. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 54: 20-4.
- Banin, E., Hughes, D., and Kuipers, O.P., 2017. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 41: 450-452.
- Berhe, D.F., Beyene, G.T., Seyoum, B., Gebre, M., Haile, K., Tsegaye, M., Boltena, M.T., Tesema, E., Kibret, T.C., Biru, M., Siraj, D.S., Shirley, D., Howe, R., and Abdissa, A. 2021. Prevalence of antimicrobial resistance and its clinical implications in Ethiopia: a systematic review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 10: 168-182.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., and Karaman, R. 2020. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. 25: 1340-1363.
- Cocker, D., Chidziwisano, K., Mphasa, M., Mwapasa, T., Lewis, J.M., Rowlingson, B., Sammarro, M., Bakali, W., Salifu, C., Zuza, A., Charles, M., Mandula, T., Maiden, V., Amos, S., Jacob, S.T., Kajumbula, H., Mugisha, L., Musoke, D., Byrne, R., Edwards, T., Lester, R., Elviss, N., Roberts, A., Singer, A.C., Jewell, C., Morse, T., and Feasey, N.A. 2022. Investigating risks for human colonisation with extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Malawian households: a one health longitudinal cohort study. medRxiv.
- Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L.J., Maldonado-Anicacio, J.Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H.L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J.L., Avilés-Benítez, L.K., Feliciano-Guzmán, J.M., Peña-López, C.D., Couoh-May, C.A., Molina-Jaimes, A., Vázquez-Narvaez, E.G., Rincón-Zuno, J., Rivera-Garay, R., Galindo-Espinoza, A., Martínez-Ramírez, A., Mora, J.P., Corte-Rojas, R.E., López-Ovilla, I., Monroy-Colin, V.A., Barajas-Magallón, J.M., Morales-De-la-Peña, C.T., Aguirre-Burciaga, E., Coronado-Ramírez, M., Rosales-García, A.A., Ayala-Tarín, M.-J., Sida-Rodríguez, S., Pérez-Vega, B.A., Navarro-Rodríguez, A., Juárez-Velázquez, G.E., Cetina-Umaña, C.M., Mena-Ramírez, J.P., Canizales-Oviedo, J., Moreno-Méndez, M.I., Romero-Romero, D., Arévalo-Mejía, A., Cobos-Canul, D.I., Aguilar-Orozco, G., Silva-Sánchez, J., and Camacho-Ortiz, A. 2019. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*. 14(3): e0209865.
- Gupta, V., and Datta, P. 2019. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: antibiotic hybrids. *Indian Journal of Medical Research*. 149(2): 97-106.
- Hermann, J.C., Hensen, C., Ridder, L., Mulholland, A.J., and Höltje, H.-D. 2005. Mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modeling of the acylation reaction of a class a β -lactamase with benzylpenicillin. *Journal of the American Chemical Society*. 127: 4454-4465.
- Huang, H., Chen, B., Liu, G., Ran, J., Lian, X., Huang, X., Wang, N., and Huang, Z. 2018. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Infectious Diseases*. 18(1): 11-17.

- Humphries, D.L., Scott, M.E., and Vermund, S.H. (Eds.), 2021. Nutrition and infectious diseases: shifting the clinical paradigm. Springer International Publishing, Cham.
- Jernigan, J.A., Hatfield, K.M., Wolford, H., Nelson, R.E., Olubajo, B., Reddy, S.C., McCarthy, N., Paul, P., McDonald, L.C., Kallen, A., Fiore, A., Craig, M., and Baggs, J. 2020. Multidrug-resistant bacterial infections in U.S. hospitalized patients, 2012–2017. *The New England Journal of Medicine*. 382(14): 1309-1319.
- Kadel, S., and Kovats, S. 2018. Sex hormones regulate innate immune cells and promote sex differences in respiratory virus infection. *Frontiers in Immunology*. 9: 1653-1668.
- Khouja, T., Mitsantisuk, K., Tadrous, M., and Suda, K.J., 2022. Global consumption of antimicrobials: im-pact of the WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance and 2019 coronavirus pan-demic (COVID-19). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77, 1491-1499.
- Klein, S.L., and Flanagan, K.L. 2016. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 16: 626-638.
- López-Jácome, L.E., Fernández-Rodríguez, D., Franco-Cendejas, R., and Camacho-Ortiz, A., 2022. Increment antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic: Results from the Invifar Network. *Antimicrobial Resistance*. 28(3): 338-345.
- López-Pueyo, M.J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., and Garnacho-Montero, J. 2011. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*. 35: 41-53.
- Marín, M., and Gudiol, F. 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(2): 116-129.
- Martin, D., Fougnot, S., Grobost, F., Thibaut-Jovelin, S., Ballereau, F., Gueudet, T., de Mouy, D., Robert, J., Alexandre, F., Andorin, P., Artur, F., Banctel, H., Bayette, J., Bonfils, F., Boraud, D., Camiade, S., Caillon, J., Capron, N., Chatelain, N., Coudé du Foresto, B., Cous, G., Desroys du Roure, V., Doermann, H.-P., Dubouix, A., Fougnot, S., Galinier, J.-L., Grandjean, G., Grisard, D., Grobost, F., Gueudet, T., Hance, P., Holstein, A., Jendrysik, M.-F., Jobert, E., Kamdem-Djoko, J.-R., Lair, D., Le Bris, J.-M., Lecordier, N., Liébault, S., Lièvre, N., Nalpas, J., Payro, G., Poirey, B., Pradier, E., Prots, L., Rault, J.-P., Roche, M.-L., Thierry, J., Valade, H., Versini, P., Vrain, A., and Weber, P. 2016. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *Journal of Infection*. 72(2): 201-206.
- More People Died of Antibiotic-Resistant “Superbugs” Than HIV/AIDS In 2019; Sub-Saharan Africa Worst Affected - Health Policy Watch, 2022. URL <https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-to-bacterial-infections-killed-more-people-than-hiv-aids-in-2019-new-lancet-study-shows/> (accessed 2.23.23).
- Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Khorana, M., Kisooson, N., Kobeissi, E., Kostyanev, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Mussi-Pinhata, M.M., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Peleg, A.Y., Perrone, C., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rudd, K.E., Russell, N., Schnall, J., Scott, J.A.G., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Turner, C., Turner, P., van Doorn, H.R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vu, H., Walsh, T., Waner, S., Wangrangsimaikul, T., Wozniak, T., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., and Naghavi, M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 399, 629-655.
- Navarro-Navarro, M., Robles-Zepeda, R.E., Garibay-Escobar, A., and Ruiz-Bustos, E. 2011. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Pública de México*. 54(4): 341-344.
- Patel, J., Harant, A., Fernandes, G., Mwamelo, A.J., Hein, W., Dekker, D., and Sridhar, D. 2023. Measuring the global response to antimicrobial resistance, 2020–21: a systematic governance analysis of 114 countries. *The Lancet Infectious Diseases*. S1473309922007964.
- Rello, J., Kalwaje Eshwara, V., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R.G., Conway-Morris, A., Rojas, J.N., Alp, E., and Zhang, Z. 2019. A global priority list of the TOP TEN resistant microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 38(2): 319-323.
- Resistencia antimicrobiana [WWW Document], 2023. URL <https://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-publica/investigacion/resistencia-antimicrobiana.html> (accessed 2.24.23).
- Rolain, J.-M., Abat, C., Jimeno, M.-T., Fournier, P.-E., and Raoult, D. 2016. Do we need new antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection*. 22(5): 408-415.
- Russ, D., Glaser, F., Shaer Tamar, E., Yelin, I., Baym, M., Kelsic, E.D., Zampaloni, C., Haldimann, A., and Kishony, R. 2020. Escape mutations circumvent a tradeoff between resistance to a beta-lactam and resistance to a beta-lactamase inhibitor. *Nature Communications*. 11(1): 2029-2038.
- Sadighi Akha, A.A. 2018. Aging and the immune system: an overview. *Journal of Immunological Methods*. 463: 21-26.
- Tejada Llacsa, P.J., Huarcaya, J.M., Melgarejo, G.C., Gonzales, L.F., Cahuana, J., Pari, R.M., Bohorquez, H.L., and Chacaltana, J. 2015. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de la Facultad de Medicina*. 76(2): 161-166.
- Torres Soto, N.Y., López Franco, G., Torres Soto, N.A., Aray Roa, A., Monzalvo Curiel, A., Peña Torres, E.F., and Rojas Armadillo,

M.D.L., 2022. Risk perception about the covid-19 pandemic and its effect on self-medication practices in population of northwestern Mexico. *Acta Universitaria* 32, 1-14.

vom Steeg, L.G., and Klein, S.L. 2016. SeXX matters in infectious disease pathogenesis. *PLoS Pathogens*. 12(2): e1005374.

Zúniga-Moya, J.C., Bejarano-Cáceres, S., Valenzuela-Cervantes, H., Gough-Coto, S., Castro-Mejía, A., Chinchilla-López, C., Díaz-Mendoza, T., Hernández-Rivera, S., and Martínez-López, J. 2016. Antibiotic sensitivity profile of bacteria in urinary tract infections. *Acta Médica Costarricense*. 58(4): 146-153.

Prevalence of Bacterial Resistance from 2016 to 2018 at the General Hospital of Obregon, Sonora

Prevalencia de resistencia bacteriana de 2016 a 2018 en el Hospital General de Obregón, Sonora

Javier Nicolás González-González¹, Ildefonso Guerrero-Encinas¹, Marco Antonio Sotomayor-Demoss², Yolanda Alicia López-Olivas², Gloria Guadalupe Morales-Figueroa¹, Luis Quihui-Cota¹, Edith Valbuena-Gregorio³ & Marco Antonio López-Mata^{3*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Col. La Victoria, 83304. Hermosillo, Sonora, México.

² Hospital General de Ciudad Obregón. Boulevard Rodolfo Elías Calles, Fovissste 2, 85140. Ciudad Obregón, Sonora, México.

³ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. Bordo Nuevo S/N, A.P. 85040, Antiguo Providencia, Cd. Obregón, Sonora, México.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance in Mexico is difficult to address due to the absence of a regulatory instance that effectively control the use and sale of antimicrobials; and the low surveillance of prescription and self-medication. This study aimed to determine the prevalence of bacterial resistance to antibiotics isolated from clinical samples in the General Hospital of Obregon, Sonora. Information was obtained from the culture logs processed and analyzed at the Microbiology area of the Clinical Laboratory and its resistance to antibiotics, from December 2016 to January 2018. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* infections were the most common among patients from all care services. Bacteria such as *S. aureus* and *E. coli*, showed antibiotic resistance of up to 90 and 100 %. A high resistance was observed against benzylpenicillin at the intensive care unit service (100 %). High bacterial resistance to antibiotics was found from December 2016 to January 2018 in the present study, and this apparently remains unchanged in our country which was inferred by data reported by previous few Mexican studies.

Keywords: Antimicrobial resistance; Surveillance; Antibiotics; Antibiogram; *E. coli*; Mexican hospital.

RESUMEN

En México, la resistencia a los antimicrobianos es difícil de abordar debido a la ausencia de un organismo regulador que controle de manera efectiva el uso y la venta de antimicrobianos; y la baja vigilancia de prescripción y automedicación. Este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de muestras clínicas en el Hospital General de Obregón, Sonora. En este estudio se recolectó información de los cultivos que se realizaron en el área de Microbiología del Laboratorio de Análisis Clínicos y su resistencia a antibióticos, desde diciembre de 2016 hasta enero de 2018, en el Hospital General de Obregón, Sonora. Las infecciones por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* fueron las más frecuentes entre los pacientes de todos los servicios de atención.

*Correspondence author: Marco Antonio López-Mata
e-mail: marco.lopezmata@unison.mx

Received: June 12, 2023

Accepted: August 2, 2023

Published: September 20, 2023

Bacterias, como *E. coli* y *S. aureus* mostraron resistencia a los antibióticos hasta en un 90 y 100 %. La bencilpenicilina fue el antibiótico al que se observó alta resistencia en el servicio de cuidados intensivos (100 %). En el presente estudio se encontró una alta resistencia bacteriana a los antibióticos desde diciembre de 2016 hasta enero de 2018 y, en comparación con pocos estudios mexicanos, se ha mantenido sin cambios.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana; Vigilancia; Antibióticos; Antibiograma; *E. coli*; hospital mexicano.

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance occurs when microorganisms, such as bacteria, acquire or develop biological mechanisms that make drugs no longer effective. This phenomenon can cause different problems in health systems, ranging from high morbidity and mortality to high medical costs worldwide (Kok *et al.*, 2022; Liguori *et al.*, 2022).

In Mexico, the concern of optimal surveillance in hospitals on bacterial resistance or multi-resistance has grown recently. The main bacteria associated with infections reported by Mexican hospitals include *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp. and *Acinetobacter baumannii* (Garza-González *et al.*, 2020).

Some factors can lead to the presence of these infections, for example the reduction of patient immunity, a greater variety of medical procedures, invasive techniques, and the transmission of drug-resistant bacteria within patients in crowded hospitals (Bakkeren *et al.*, 2020). On the other hand, factors such as age, sex, nutritional status, and the presence of other concomitant pathologies can also play an important role (Humphries *et al.*, 2021). Even so, there are different variations and frequencies of these infections among populations which should be recorded for a better understanding of the problem, and to propose specific solutions.

Despite some epidemiological surveillance programs in northwest Mexico, a high rate of resistance to first-choice antibiotics is reported by health institutions (Bolado-Martínez

et al., 2018; 2022). A systematic governance analysis of global response to antimicrobial resistance, revealed a lack of research, monitoring, and evaluation of this health problem in Mexico. This is a reason for alert which encourages greater care in resistance patterns and surveillance programs (Patel *et al.*, 2023). This step is important to know the length of the problem at the different health centers in northwest Mexico (Navarro-Navarro *et al.*, 2013), to support decision-makers to build programs with actions to reduce the prevalence, morbidity and mortality associated to bacterial antibiotic resistance.

Therefore, the present work aims to generate two-year-epidemiological information on the prevalence of antibacterial resistance from samples of different service areas in a second Level Hospital in Northwest Mexico.

MATERIAL AND METHODS

A retrospective study was carried out at a hospital of northwest Mexico. Information was collected from the culture logs of processed and analyzed samples at the Microbiology area of the Clinical Laboratory, from December 2016 to January 2018. Data from 1915 cultures with and without antibiogram from hospitalized and non-hospitalized patients (External Consultation area) were collected and processed using an Excel program database. Complete antibiogram and complete demographic information (date of the study, sex, age, and hospital unit service) was considered as inclusion criteria ($n = 834$). The age-range was from 0 to 99 years old. The diagnostic equipment used was the VITEK® 2 Compact (Biomeireux) with an extensive database for the identification of different microorganisms, which included information on bacterial sensitivity (S) and resistance (R) to different antibiotics. The collected data underwent processing, enabling analysis of the prevalence by bacterial species and care services.

Statistical Analysis

The prevalence of isolated bacteria was estimated by age groups, sex, and service areas. In addition, these variables were used to determine the prevalence of bacterial resistance and sensitivity. The above was calculated as percentage using the formula: $P = (PR/N) \times 100$, where PR is the number of samples with bacterial resistance and/or sensitivity to antibiotics, N is the total number of samples recorded, and multiplied by one hundred. Difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria, and the prevalence of antibiotic resistance and/or sensitivity was compared using the two sided Chi-square test with the package SPSS, 2011, at significant level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

General prevalence.

An overall bacterial prevalence of 42.8 % from 1945 records within the period December 2016 and January 2018 was estimated. The prevalence of bacterial species is shown in Table

1. *Escherichia coli* (44.3 %) showed the highest prevalence followed by *Klebsiella pneumoniae* (7.2 %), *Staphylococcus aureus* (6.3 %), *Staphylococcus epidermidis* (6.2 %) and *Pseudomonas aeruginosa* (5.2 %). On the other hand, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Achromobacter denitrificans*, *Aeromonas caviae*, *Cronobacter sakazakii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Morganella* spp., *Shigella sonnei*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Plesiomonas shigelloides*, *Ralstonia pickettii*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus* spp., *Kocuria rosea*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parasanguinis* and *Streptococcus constellatus* showed the lowest prevalence (≈ 0.12 %).

Regarding the high prevalence of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* found in this study, a number of studies in the European Union (19,888 patients) published in 2012 also reported a high prevalence of hospital infections by *E. coli* (15.2 %), *S. aureus* (12.1 %), *P. aeruginosa* (11.2 %), and *K. pneumoniae* (8.1 %) (Zarb *et al.*, 2012). Despite the level of prevalence and rank order are different to our results, the isolated bacterial species are the same. On the other hand, a surveillance network (PRONARES) in Chile, reported *E. coli* (35.9 %), *S. aureus* (20.6 %), and *Klebsiella* spp. (9.5%) as the predominant isolated species from a total of 5,251 biological samples (Trucco *et al.*, 2002). Similarly, a meta-analysis from 40 different studies published in 2022, reported diarrheagenic *E. coli* as the most prevalent bacteria in Asia (22.8%) (Salleh *et al.*, 2022). However, identification of type of *E. coli* in this study was not performed.

Prevalence according to Gram classification

Regarding 834 Gram stains, the prevalence of Gram-negative bacteria was significantly higher (613 isolates; 73.5 %) than Gram-positive bacteria (221 isolates; 26.5 %) ($p < 0.05$) (Figure 1).

In Mexico, reports from Leon Guanajuato and Mexico city in 2012 revealed a higher prevalence of Gram-positive (51.2 %) than Gram-negative bacteria (48.8 %) from 5,117 clinical cultures (Duarte-Raya and Granados-Ramírez, 2012). On the other hand, a previous study carried out at the State Cancer Center of ISSEMYM (Social Security Institute of the State of Mexico and Municipalities) in Mexico, reported 787 (59.9 %) infections associated to Gram-negative bacteria and 401 (30.5 %) to Gram-positive bacteria from a total of 1,313 infections (Romero *et al.*, 2013). Differences between these trends may be attributed to influx of staff, patients, and contact with outside air in waiting rooms, and different cleaning and disinfection procedures by hospital services (Zambrano-Gari and Luna-Fontalvo, 2013).

Prevalence of bacteria per service unit

Table 2 shows the bacterial prevalence from 834 positive records per service unit. The service with the highest overall prevalence of bacterial species was the internal medicine (IM) with 241 isolates (28.8 %), followed by external consultation (EC) with 133 isolates (15.9 %); gynecology (GYNE) with 82 isolates (9.8 %); neonatal special care unit (NSCU) with 81

Table 1. General prevalence of bacterial species isolated from clinical samples (n = 834).
Tabla 1. Prevalencia general de especies bacterianas aisladas de muestras clínicas (n = 834).

Bacterial specie	Prevalence n (%)	Bacterial specie	Prevalence n (%)
<i>Escherichia coli</i>	371 (44.3 %)	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2 (0.2 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	61 (7.2 %)	<i>Pantoea spp.</i>	2 (0.2 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	53 (6.3 %)	<i>Streptococcus anginosus</i>	2 (0.2 %)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	52 (6.2 %)	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2 (0.2 %)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44 (5.2 %)	<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (0.1 %)
<i>Enterobacter cloacae</i>	41 (4.9 %)	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (0.1%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	34 (4.0 %)	<i>Achromobacter denitrificans</i>	1 (0.1 %)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	26 (3.1 %)	<i>Aeromonas caviae</i>	1 (0.1 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	16 (1.9 %)	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1 (0.1 %)
<i>Proteus mirabilis</i>	16 (1.9 %)	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1 (0.1 %)
<i>Staphylococcus hominis</i>	15 (1.7 %)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1 (0.1 %)
<i>Streptococcus mitis</i>	15 (1.7 %)	<i>Morganella spp.</i>	1 (0.1 %)
<i>Staphylococcus warneri</i>	11 (1.3 %)	<i>Shigella sonnei</i>	1 (0.1 %)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9 (1.0 %)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1 (0.1 %)
<i>Morganella morganii</i>	7 (0.8 %)	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1 (0.1%)
<i>Citrobacter freundii</i>	5 (0.6 %)	<i>Ralstonia pickettii</i>	1 (0.1 %)
<i>Shigella spp.</i>	5 (0.6 %)	<i>Streptococcus intermedius</i>	1 (0.1 %)
<i>Serratia marcescens</i>	4 (0.4 %)	<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0.1 %)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4 (0.4 %)	<i>Bacillus spp.</i>	1 (0.1 %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 (0.4 %)	<i>Kocuria rosea</i>	1 (0.1 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4 (0.4 %)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (0.1 %)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4 (0.4 %)	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1 (0.1 %)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3 (0.3 %)		
<i>Pseudomonas putida</i>	2 (0.2 %)	<i>Streptococcus constellatus</i>	1 (0.1 %)
<i>Providencia rettgeri</i>	2 (0.2 %)		

n =number of bacterial isolates.

isolates (9.7 %); pediatrics (PED) and emergency department (ED) with 75 isolates each one (8.9 %); surgery (SUR) with 64 (7.6 %); and pediatric emergencies (PEDE) with 52 (6.2 %). The intensive care unit (ICU) service showed the lowest prevalence (15 isolates, 1.7 %).

The area with the highest reported infections was the IM (28.8 %) in this study. A study carried out in 2013 with 126 patients at the Mexican Social Security Institute in Salamanca, Guanajuato, and Mexico City, reported a 9.5 % prevalence of hospital infections from which the highest prevalence (16.2 %) was observed at the IM area, followed by the SUR (12.5 %), the traumatology and orthopedics (5 %), and the GYNE and obstetrics (3.1 %). The high prevalence of infections at the IM in this study, is probably associated to the location of the urology service at the IM, where most urine culture analysis are performed (Castañeda-Martínez and Valdespino-Padilla, 2015).

In relation to EC, the second service unit with the major number of isolates, it showed the highest demand for

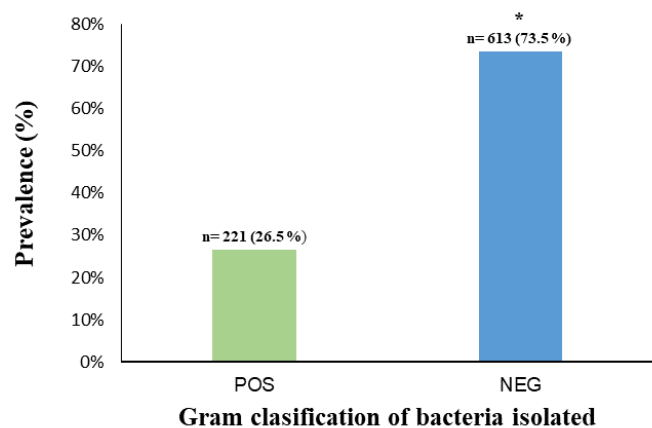


Figure 1. General prevalence (%) of bacterial isolates from 834 clinical samples according to their Gram classification. *Significant p-value by the Chi-square test.

Figura 1. La prevalencia general (%) de bacterias aisladas de 834 aislamientos de muestras clínicas según su clasificación Gram. *Valor p significativo por Chi-cuadrado prueba.

Table 2. Prevalence of bacterial species isolated from clinical samples (n=834) by care services.**Tabla 2.** Prevalencia de especies bacterias aisladas de muestras clínicas (n=834) por servicios asistenciales.

Bacteria especie	EC	SUR	GYNE	IM	PED	ICU	NSCU	ED	PEDE	INTERN
<i>S. aureus</i>	10.5%	4.6%	3.6%	3.3%	17.3%	6.6%	4.9%	5.3%	5.7%	0.0%
<i>S. haemolyticus</i>	3.7%	4.6%	3.6%	1.6%	6.6%	20.0%	7.4%	4.0%	3.8%	0.0%
<i>S. hominis</i>	3.0%	0.0%	1.2%	0.4%	2.6%	13.3%	3.7%	2.6%	0.0%	0.0%
<i>S. warneri</i>	6.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.2%
<i>S. epidermidis</i>	3.7%	3.1%	1.2%	1.2%	10.6%	6.6%	34.5%	1.3%	0.0%	18.7%
<i>S. agalactiae</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>S. capitis</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>S. lugdunensis</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>E. faecalis</i>	3.0%	3.1%	0.0%	2.0%	0.0%	6.6%	2.4%	2.6%	1.9%	0.0%
<i>S. agalactiae</i>	0.0%	0.0%	2.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>S. intermedius</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>S. mitis</i>	0.7%	3.1%	0.0%	3.3%	2.6%	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%	0.0%
<i>S. anginosus</i>	0.0%	1.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>S. pneumoniae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	1.9%	6.2%
<i>S. gallolyticus</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>S. pyogenes</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.4%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>Bacillus spp.</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>K. rosea</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>S. dysgalactiae</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>S. parasanguinis</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>S. constellatus</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>E. coli</i>	48.8%	43.7%	65.8%	58.0%	22.6%	6.6%	22.9%	30.6%	34.6%	37.5%
<i>K. pneumoniae</i>	7.5%	7.8%	9.7%	7.4%	12.0%	0.0%	3.7%	8.0%	3.8%	0.0%
<i>K. oxytoca</i>	0.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	1.9%	0.0%
<i>A. baumannii</i>	0.7%	6.2%	0.0%	3.3%	2.6%	13.3%	1.2%	5.3%	1.9%	18.7%
<i>A. iwoffii</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>S. maltophilia</i>	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Pantoea spp.</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	6.2%
<i>S. marcescens</i>	0.0%	1.5%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	1.2%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>Shigella spp.</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	3.8%	0.0%
<i>S. sonnei</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>E. aerogenes</i>	0.0%	0.0%	1.2%	0.0%	1.3%	13.3%	3.7%	2.6%	1.9%	0.0%
<i>E. cloacae</i>	5.2%	6.2%	2.4%	3.3%	10.6%	0.0%	8.6%	0.0%	3.8%	6.2%
<i>Morganella spp.</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>M. morgani</i>	0.0%	3.1%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	1.9%	0.0%
<i>A. denitrificans</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>A. xylosoxidans</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>P. aeruginosa</i>	2.2%	7.8%	0.0%	7.8%	4.0%	13.3%	6.1%	4.0%	7.6%	0.0%
<i>P. putida</i>	0.0%	0.0%	1.2%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>P. mirabilis</i>	0.0%	3.1%	0.0%	1.2%	1.3%	0.0%	0.0%	4.0%	3.8%	0.0%
<i>A. caviae</i>	0.0%	0.0%	6.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%
<i>C. sakazakii</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
<i>C. freundii</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	1.9%	0.0%
<i>R. ornithinolytica</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.0%
TOTAL (n%)	133 15.9%	64 7.6%	82 9.8%	241 28.8%	75 8.9%	15 1.7%	81 9.7%	75 8.9%	52 6.2%	16 1.9%

n = number of bacterial isolates per care services; External Consultation (EC); Surgery (SUR); Gynecology (GYNE); Internal Medicine (IM); Pediatrics (PED); Gynecology (GYNE), Internal Medicine (IM); Intensive Care Unit (ICU); Neonatal Special Care Unit (NSCU); Emergency Department (ED); Pediatric Emergencies (PEDE).

laboratory requests. Therefore, this area can be regarded as an indicator of frequency and type of bacterial infections affecting a community.

On the other hand, a 2014 study of 360 samples at the Fernando Troconis University Hospital in Colombia, reported *S. haemolyticus* as the most prevalent bacterium at the ICU service (81.1 %) (Vélez-Pereira and Caicedo, 2014). In this study, this bacterium also showed the highest prevalence at the ICU service (20 %). It should be noted that this bacterium can be easily transmitted between the potential sources of infection and hosts, such as patients, medical personal, and routine equipment.

Apparently, the uncontrolled application of broad-spectrum antibiotics in ICU patients promotes the settlement of bacterial infections by opportunistic pathogens. This may be due to unawareness of the site of infection and the etiological agent, or prolonged use of catheters and often probes, as well as the contamination provoked by the personnel in charge of patient care (Russotto *et al.*, 2015).

Prevalence by age and sex groups

Table 3 shows the prevalence of the main bacterial species isolated by age groups from 834 isolates. *E. coli* was predominant in all age groups, and increased with age, being those over 60 years (52 %) the most susceptible age group. A study carried out at two cities of Honduras in 2014, analyzed 602 bacterial isolates, of which 84 (14 %) were from the 0-10 years group, 30 (5 %) from the 11 - 20 years group, 260 (43 %) from the 21 - 60 years group, and 205 (34 %) from people over 61 years old. In addition, authors observed a higher prevalence of hospital infections in people over 18 years of age, but particularly in the age over 60 years (Zúniga-Moya *et al.*, 2016). It was proposed that older people are more sensitive to various stressors associated to a progressive loss of cellular homeos-

Table 3. Prevalence of bacteria isolated from 834 clinical samples by age groups.

Tabla 3. Prevalencia de bacterias aisladas de 834 muestras clínicas por grupos de edad.

Age (N)	Bacteria specie	n (%)
0-17 (268)	<i>E. coli</i>	79 (29.4 %)
	<i>S. epidermidis</i>	40 (14.9 %)
	<i>S. aureus</i>	29 (10.8 %)
	<i>E. cloacae</i>	24 (8.9 %)
18-59 (413)	<i>E. coli</i>	210 (50.8 %)
	<i>K. pneumoniae</i>	37 (8.9 %)
	<i>S. aureus</i>	20 (4.8 %)
	<i>P. aeruginosa</i>	16 (3.8 %)
60-99 (153)	<i>E. coli</i>	81 (52.9 %)
	<i>P. aeruginosa</i>	16 (10.4 %)
	<i>K. pneumoniae</i>	11 (7.1 %)
	<i>E. faecalis</i>	5 (3.2 %)

N= total number per age of bacterial isolates of patients; n= number of bacterial isolates.

tasis which may lead to immunosenescence and greater exposure to different ailments (Ciaglia *et al.*, 2022).

On the other hand, Table 4 shows *E. coli* as the most isolated bacteria from male and female patients. A higher prevalence was observed in female (50.8 %), with 251 isolates, than in male (35 %) patients with 119 isolates (p < 0.05). Furthermore, male had a higher prevalence of infections by *P. aeruginosa* (9.4 %), *S. aureus* (8.2 %) and *E. cloacae* (7.3 %).

The disparity in infection prevalence between male and female patients may be explained by the anatomical and physiological differences which may promote a greater predisposition to urinary tract infections, particularly in female (Alós, 2005). Likewise, other studies have reported that female are more susceptible to infections, but a clear physiological explanation for this event has not yet been proposed (Combes *et al.*, 2009).

Table 4. Prevalence of the main bacteria isolated from 494 female and 340 male clinical samples.

Tabla 4. Prevalencia de las principales bacterias aisladas de muestras clínicas de 494 mujeres y 340 hombres.

Bacteria isolated	Female n (%)	Male n (%)	p
<i>E. coli</i>	251 (50.8 %)	119 (35 %)	< 0.05*
<i>K. pneumoniae</i>	37 (7.5 %)	24 (7.1 %)	> 0.05
<i>S. epidermidis</i>	33 (6.7 %)	19 (5.6 %)	> 0.05
<i>S. aureus</i>	25 (5.1 %)	28 (8.2 %)	> 0.05
<i>S. haemolyticus</i>	21 (4.3 %)	13 (3.8 %)	> 0.05
<i>E. cloacae</i>	16 (3.2 %)	25 (7.4 %)	< 0.05*
<i>P. aeruginosa</i>	12 (2.4 %)	32 (9.4 %)	< 0.05*
<i>P. mirabilis</i>	12 (2.4 %)	-	-
<i>S. warneri</i>	10 (2.0 %)	-	-
<i>A. baumannii</i>	9 (1.8 %)	17 (5 %)	< 0.05*

*Significant p value by the Chi-square test. - No report of cases.

Prevalence of resistance and sensitivity

Table 5 shows the resistance and sensitivity prevalence by the most isolated bacteria from 834 clinical samples. The highest resistance was shown by *K. pneumoniae* to ampicillin (AMP) (100 %) and nitrofurantoin (NIT) (50.0 %); *P. aeruginosa* to trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) (100.0 %), AMP (97.6 %), and ampicillin/sulbactam (SAM) (97.6 %); *Enterobacter cloacae* to cefazolin (CZO) (100 %) and NIT (69.4 %), *S. aureus* (90.3 %) and *S. epidermidis* (97.7 %) to benzylpenicillin (PEN); and *E. coli* to AMP (78.3 %) and SAM (68.4 %).

On the other hand, the species which showed the highest sensitivity were *E. coli* to meropenem (MEM) (99.4 %) and tigecycline (TGC) (99.1 %); *K. pneumoniae* (98.2 %) to MEM, ertapenem (ETP), and amikacin (AMK); *S. aureus* (98.0 %) to TGC, vancomycin (VAN), SXT, NIT, Quinupristin/Dalfopristin (QDA), Linezolid (LNZ), and Rifampicin; *S. epidermidis* (100 %) to TGC, QDA, NIT, and LNZ; *P. aeruginosa* (72.09 %) to gentamicin (GEN) and Piperacillin/Tazobactam (TZP); and *E. cloacae* (88.89 %) to MEM, AMK, and TGC.

Table 5. Prevalence of bacterial resistance (%R) and sensitivity (%S) to the most frequently used antibiotics.**Tabla 5.** Prevalencia de resistencia bacteriana (%R) y sensibilidad (%S) a los antibióticos más utilizados

Antibiotic	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. cloacae</i>	
	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S
AMP	78.3%	21.4%	100.0%	0.0%	-	-	-	-	97.6%	2.3%	-	-
PEN	-	-	-	-	90.3%	9.6%	97.7%	2.2%	-	-	-	-
OXA	-	-	-	-	11.5%	88.4%	86.3%	13.6%	-	-	-	-
CZO	40.0%	60.0%	20.6%	79.3%	-	-	-	-	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%
CRO	38.0%	61.9%	20.6%	79.3%	-	-	-	-	97.6%	2.3%	47.2%	52.7%
FEP	37.1%	62.8%	20.6%	79.3%	-	-	-	-	34.8%	65.1%	16.6%	83.3%
ATM	37.1%	62.8%	20.6%	79.3%	-	-	-	-	-	-	47.2%	52.7%
SAM	68.4%	31.5%	34.4%	65.5%	-	-	-	-	97.6%	2.3%	-	-
TZP	11.2%	87.6%	15.5%	84.4%	-	-	-	-	23.2%	72.0%	25.0%	75.0%
ETP	0.5%	99.1%	1.7%	98.2%	-	-	-	-	50.0%	50.0%	16.6%	83.3%
MEM	0.2%	99.4%	1.7%	98.2%	-	-	-	-	34.8%	65.1%	11.1%	88.8%
CIP	47.6%	52.3%	24.1%	75.8%	11.5%	88.4%	65.9%	34.0%	34.8%	65.1%	13.8%	86.1%
LVX	-	-	-	-	11.5%	88.4%	65.9%	34.0%	-	-	-	-
MFX	-	-	-	-	9.6%	90.3%	38.6%	61.3%	-	-	-	-
AMK	1.1%	98.8%	1.7%	98.2%	-	-	-	-	34.8%	65.1%	11.1%	88.8%
GEN	29.8%	70.1%	12.0%	87.9%	3.8%	96.1%	77.2%	22.7%	27.9%	72.0%	16.6%	83.3%
TOB	34.9%	65.0%	24.1%	75.8%	-	-	-	-	34.8%	65.1%	30.5%	69.4%
NIT	12.6%	87.3%	50.0%	50.0%	1.9%	98.0%	0.0%	100.0%	100.0%	0.0%	69.4%	30.5%
SXT	56.9%	42.5%	29.3%	70.6%	1.9%	98.0%	61.3%	38.6%	100.0%	0.0%	33.3%	66.6%
ERY	-	-	-	-	13.4%	86.5%	79.5%	20.4%	-	-	-	-
CLI	-	-	-	-	13.4%	86.5%	65.9%	34.0%	-	-	-	-
TCY	-	-	-	-	3.8%	96.1%	6.8%	93.1%	-	-	-	-
TGC	0.5%	99.1%	5.1%	94.8%	1.9%	98.0%	0.0%	100.0%	100.0%	0.0%	11.1%	88.8%
QDA	-	-	-	-	1.9%	98.0%	0.0%	100.0%	-	-	-	-
LNZ	-	-	-	-	1.9%	98.0%	0.0%	100.0%	-	-	-	-
RIF	-	-	-	-	1.9%	98.0%	2.2%	97.7%	-	-	-	-
VAN	-	-	-	-	1.9%	98.0%	2.2%	97.7%	-	-	-	-
ESBL	38.3%	61.6%	20.6%	79.3%								

Ampicillin (AMP); Benzylpenicillin (PEN); Oxacillin (OXA); Cefazolin (CZO); Ceftriaxone (CRO); Cefepime (FEP); Aztreonam (ATM); Ampicillin/Sulbactam (SAM); Piperacillin/Tazobactam (TZP); Ertapenem (ETP); Meropenem (MEM); Ciprofloxacin (CIP); Levofloxacin (LVX); Moxifloxacin (MFX); Amikacin (AMK); Gentamicin (GEN); Tobramycin (TOB); Nitrofurantoin (NIT); trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT); erythromycin (ERY); Clindamycin (CLI); Tetracycline (TCY); Tigecycline (TGC); Quinupristin/Dalfopristin (QDA); Linezolid (LNZ); Rifampicin (RIF); Vancomycin (VAN); extended spectrum beta-lactamases (ESBL).

Among the few published Mexican studies on bacterial resistance, the State Oncology Center of the Mexican Institute of Social Security of the State of Mexico, and Municipalities (ISSEMYM) in 2012, analyzed 4,652 samples and reported a high resistance of *E. coli* to AMP (86.7 %), ciprofloxacin (86.1 %), levofloxacin (85.3 %); and from 1,313 records *P. aeruginosa* (100 %) to tetracycline, CZO, and ceftriaxone (CRO). In addition, *S. aureus*, showed a high resistance to PEN (92.2 %), erythromycin (62.9 %), and clindamycin (62.4 %), and *S. epidermidis* with a similar resistance trend to the same antibiotics (Romero *et al.*, 2013). On the other hand, it has been recognized that the most common resistant bacteria associated to hospital infections are *E. coli*, *K. pneumoniae*,

and *P. aeruginosa* (Rello *et al.*, 2019). In addition, an increase in resistance has been observed against CRO and amoxicillin (Rolain *et al.*, 2016). It is probably that the number of bacteria capable of generating extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) has increased worldwide (Hermann *et al.*, 2006).

Antimicrobial resistance mechanisms can be categorized into four primary groups: (1) restricting drug uptake, (2) altering drug targets, (3) deactivating drugs, and (4) actively expelling drugs. Intrinsic resistance may involve limited drug uptake, drug deactivation, and drug efflux; while acquired resistance mechanisms may include modifying drug targets, drug deactivation, and drug efflux. Variations in structures lead to differences in the mechanisms used by gram-negative

and gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria use all four main mechanisms, while gram-positive bacteria use less frequently the limiting drug uptake (due to the absence of an LPS outer membrane) and lack the capacity for certain types of drug efflux mechanisms (Reygaert, 2018).

Finally, a high prevalence of *A. baumannii* (8.61 %), *E. coli* (38.03 %), *K. pneumoniae* (37.41 %) and *P. aeruginosa* (15.94%) have been reported by some hospitals in Saudi Arabia (Aloraifi *et al.*, 2023). A systematic review, from 2011 to 2021, reported that these bacteria are the most common multidrug-resistant specifically to aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, related cxyimino- β -lactams, cephalosporins, and penicillins (Borgio *et al.*, 2021; Pishtiwan and Khadija, 2019). Apparently, the trends of bacterial resistance based on previous few published Mexican study data and those from this study remains unchanged, and probably is expected that this health problem increases in Mexico.

CONCLUSIONS

This study revealed a high prevalence of bacterial resistance to the first-choice antibiotics at a hospital of northwest Mexico. Infections caused by Gram-negative were more prevalent (73.5 %) than Gram-positive bacteria (26.5 %). In addition, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* were the most isolated bacteria species in all care services of the study hospital. *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*, showed a higher prevalence in male than in female, but it was the opposite trend for infections by *E. coli*. Also, a high resistance of *E. coli* to AMP (78.3 %), SAM (68.4 %), SXT (56.9 %) and ESBL (36.6 %) was found. Based on this, effective actions to reduce the impact caused by the inappropriate use of antibiotics at both local and national levels must be taken.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the Mexican Council of Humanities Science and Technology (CONAHCyT) and the General Hospital of Ciudad Obregón Sonora, México.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Aloraifi, R.I., Alharthi, A.F., Almfleh, A.A., Alamri, A.H., Alobud, A.S., Bawazeer, R.A., Alswaji, A.A., Alalwan, B., Aldriwesh, M.G., Johani, S.M.A., and 2023. Prevalence of Carbapenem Non-susceptible Gram-Negative Bacteria at Tertiary Care Hospitals in Saudi Arabia. *Cureus* 15. <https://doi.org/10.7759/cureus.33767>
- Alós, J.I. 2005. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 23, 3–8.
- Bakkeren, E., Diard, M. and Hardt, W. D. 2020. Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology* 18, 479–490.
- Bolado-Martínez, E., Nevárez-López, A.R. and Candia-Plata, M. del C. 2018. Vigilancia de la resistencia bacteriana en instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. *Salud Pública de México* 60, 117–119. <https://doi.org/10.21149/8560>
- Borgio, J.F., Rasdan, A.S., Sonbol, B., Alhamid, G., Almandil, N.B. and AbdulAzeez, S. 2021. Emerging Status of Multidrug-Resistant Bacteria and Fungi in the Arabian Peninsula. *Biology (Basel)* 10, 1144. <https://doi.org/10.3390/biology10111144>
- Castañeda-Martínez, F.C. and Valdespino-Padilla, M.G. 2015. Prevalencia de infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel de atención en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 53, 686–690.
- Ciaglia, E., Lopardo, V., Montella, F., Carrizzo, A., Di Pietro, P., Malavolta, M., Giacconi, R., Orlando, F., Cattaneo, M., Madeddu, P., Vecchione, C. and Puca, A.A. 2022. Transfer of the longevity-associated variant of BPIFB4 gene rejuvenates immune system and vasculature by a reduction of CD38+ macrophages and NAD+ decline. *Cell Death & Disease* 13, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04535-z>
- Combes, A., Luyt, C.-E., Trouillet, J.-L., Nieszowska, A. and Chastre, J. 2009. Gender impact on the outcomes of critically ill patients with nosocomial infections. *Critical Care Medicine* 37, 2506–2511. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a569df>
- Duarte-Raya, F. and Granados-Ramírez, M.P. 2012. Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 50, 289–300.
- Garza-González, E., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Ponce-de-León, A., Rodríguez-Noriega, E., Alavez-Ramírez, N., Mena-Ramírez, J.P., Rincón-Zuno, J., Fong-Camargo, M.G., Morales-De-la-Peña, C.T., Huerta-Baltazar, C.R., López-Jacome, L.E., Carnalla-Barajas, M.N., Soto-Noguerón, A., Sanchez-Francia, D., Moncada-Barrón, D., Ortiz-Brizuela, E., García-Mendoza, L., Newton-Sánchez, O.A., Choy-Chang, E.V., Aviles-Benitez, L.K., Martínez-Miranda, R., Feliciano-Guzmán, J.M., Peña-Lopez, C.D., Couoh-May, C.A., López-Gutiérrez, E., Gil-Veloz, M., Armenta-Rodríguez, L.C., Manriquez-Reyes, M., Gutierrez-Brito, M., López-Ovillo, I., Adame-Álvarez, C., Barajas-Magallón, J.M., Aguirre-Burciaga, E., Coronado-Ramírez, A.M., Rosales-García, A.A., Sida-Rodríguez, S., Urbina-Rodríguez, R.E., López-Moreno, L.I., Juárez-Velázquez, G.E., Martínez-Villarreal, R.T., Canizales-Oviedo, J.L., Cetina-Umaña, C.M., Perez-Juárez, M.M., González-Moreno, A., Romero-Romero, D., Bello-Pazos, F.D., Aguilar-Orozco, G., Barlandas-Rendón, N.R.E., Maldonado-Anicacio, J.Y., Valadez-Quiroz, A. and Camacho-Ortiz, A. 2020. The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico During the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microbial Drug Resistance* 26, 1372–1382. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0354>
- Hermann, J.C., Ridder, L., Höltje, H.-D. and Mulholland, A.J. 2006. Molecular mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modelling of deacylation in a class A β -lactamase. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4, 206–210. <https://doi.org/10.1039/B512969A>
- Humphries, D.L., Scott, M.E. and Vermund, S.H. 2021. Pathways Linking Nutritional Status and Infectious Disease: Causal and Conceptual Frameworks. En: *Nutrition and Infectious Diseases*. B. Austin (ed.), pp 3-22. Springer.

- Kok, M., Maton, L., van der Peet, M., Hankemeier, T. and van Hasselt, J.C. 2022. Unraveling antimicrobial resistance using metabolomics. *Drug Discovery Today*.
- Liguori, K., Keenum, I., Davis, B.C., Calarco, J., Milligan, E., Harwood, V.J. and Pruden, A. 2022. Antimicrobial resistance monitoring of water environments: a framework for standardized methods and quality control. *Environmental science & technology* 56, 9149–9160.
- Martínez, E.B., Arvizu, A.S.V., Ainza, M.L.Á., Álvarez-Hernández, G. and Rangel, M.A.C. 2022. Vigilancia de la resistencia bacteriana en unidades de salud de Hermosillo y Ciudad Obregón, Sonora, México. *Biotecnia* 24, 132–139.
- Navarro-Navarro, M., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Ruiz-Bustos, E., Escobar López, R. and Velázquez-Contreras, C.A. 2013. Alta prevalencia de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* uropatógena comunitaria, detectada en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 33, 66–70.
- Patel, J., Harant, A., Fernandes, G., Mwamelo, A.J., Hein, W., Dekker, D. and Sridhar, D. 2023. Measuring the global response to antimicrobial resistance, 2020-21: a systematic governance analysis of 114 countries. *The Lancet Infectious Diseases* S1473-3099(22)00796–4. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00796-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00796-4)
- Pishtiwan, A.H. and Khadija, K.M. 2019. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 11, e2019041. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.041>
- Rello, J., Kalwaje Eshwara, V., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R.G., Conway-Morris, A., Rojas, J.N., Alp, E. and Zhang, Z. 2019. A global priority list of the TOP TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 38, 319–323. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3428-y>
- Reygaert, W.C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* 4, 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rolain, J.M., Abat, C., Jimeno, M.T., Fournier, P.E. and Raoult, D. 2016. Do we need new antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection* 22, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.012>
- Romero, R.M., Acosta, D.D.M. and Ortega, A.B. 2013. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de microorganismos aislados en el Centro Oncológico Estatal del ISSEMYM. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 60, 244–251.
- Russotto, V., Cortegiani, A., Raineri, S.M. and Giarratano, A. 2015. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care* 3, 54. <https://doi.org/10.1186/s40560-015-0120-5>
- Salleh, M.Z., Nik Zuraina, N.M.N., Hajissa, K., Ilias, M.I. and Deris, Z.Z., 2022. Prevalence of Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics (Basel)* 11, 1333. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101333>
- Trucco A.O., Prado J. V. and Durán T.C. 2002. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES: Informe primer semestre 2001. *Revista chilena de infectología* 19, 140–148. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200015>
- Vélez-Pereira, A. and Caicedo, Y.C. 2014. Aerobacterias en las unidades de cuidado intensivo del Hospital Universitario Fernando Troconis, Colombia. *Revista Cubana de Salud Pública* 40, 362–368.
- Zambrano-Gari, C.C. and Luna-Fontalvo, J.A., 2013. Diversidad microbiana presente en el ambiente de la clínica odontológica de la universidad del Magdalena. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales* 8, 61–68.
- Zarb, P., Coignard, B., Griskeviciene, J., Muller, A., Vankerckhoven, V., Weist, K., Goossens, M., Vaerenberg, S., Hopkins, S., Catry, B., Monnet, D., Goossens, H. and Suetens, C. 2012. National Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey, Hospital Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey, 2012. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill* 17, 20316. <https://doi.org/10.2807/ese.17.46.20316-en>
- Zúniga-Moya, J.C., Bejarano-Cáceres, S., Valenzuela-Cervantes, H., Gough-Coto, S., Castro-Mejía, A., Chinchilla-López, C., Díaz-Mendoza, T., Hernández-Rivera, S. and Martínez-López, J. 2016. Perfil de sensibilidad a los antibióticos de las bacterias en infecciones del tracto urinario. *Acta Médica Costarricense* 58, 146–154.

Oreganón, perejil, cilantro, hierbabuena y albahaca a través de difracción de rayos x

Oregano, parsley, cilantro, mint, and basil by x-ray diffraction

Sugey López-Martínez^{1*}✉^{ORCID}, Jesús Enrique Chan-Jiménez¹, Eduardo Salvador Hernández-López¹✉^{ORCID} y Ana Rosa Rodríguez-Luna¹✉^{ORCID}

¹ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Biológicas.

RESUMEN

Las plantas tienen una historia de uso tradicional por su efecto culinario, así como su capacidad para prevenir y tratar enfermedades, contienen una gran variedad de metabolitos secundarios comúnmente etiquetados como fitoquímicos, que pueden funcionar para reducir el riesgo de enfermedades crónicas. El presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica y se analiza a las especies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Oreganón); *Eryngium foetidum* L (Perejil); *Coriandrum sativum* L (Cilantro); *Mentha spicata* L. (Hierba buena); *Ocimum basilicum* L (Albahaca) provenientes de huertos familiares de una comunidad indígena de Olcuatitán del municipio de Nacajuca, Tabasco, utilizando el método de difracción de rayos X (DRX) siendo un método exacto y completo para determinar la identidad y estructura de compuestos nuevos o conocidos, y por lo tanto vital para la investigación en química. Usando micro-protones de emisión de rayos X inducida para determinar la composición de las hojas de estas plantas, se detectaron compuestos no reportados previamente como el pirazol y n Poli (trimetilcelulosa) entre otros en las especies estudiadas, estos compuestos pueden ser utilizados para un amplio espectro de fármacos ya que contienen propiedades medicinales y desempeñan un papel importante en las personas, ya que cuentan con una gran fuente de compuestos químicos y bioactivos que favorecen a la nutrición humana.

Palabras clave: Difracción de rayos X, especies medicinales, fitoquímicos.

ABSTRACT

Plants have a history of traditional use for their culinary effect, as well as their ability to prevent and treat diseases. They contain a wide variety of secondary metabolites commonly labeled as phytochemicals, which may function to reduce the statistics of chronic diseases. In the present research, a literature review was conducted and analyzed on the *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Oreganon), *Eryngium foetidum* L (Parsley), *Coriandrum sativum* L (Coriander), *Mentha spicata* L. (Good Herb), and *Ocimum basilicum* L (Albahaca) species from home gardens of an indigenous community of Olcuatitán in the municipality of Nacajuca Tabasco. The X-ray diffraction method (XRD) was used as an accurate and complete method to determine the identity and structure of new or known

compounds, and therefore vital for research in chemistry. Using micro-proton induced X-ray emission to determine the composition of the leaves of these plants, previously unreported compounds such as pyrazole and n Poly (trimethylcellulose) among others, were detected in the species studied. These compounds can be used for a broad spectrum of drugs as they contain medicinal properties and play an important role in people, as they have a great source of chemical and bioactive compounds that favor human nutrition and that the information is available to the communities.

Keywords: X-ray diffraction, Medicinal species, Phytochemicals.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son una parte integral de todos los organismos vivos del planeta porque proporcionan alimento, aire limpio, medicamentos, ropa, sombra y refugio (Gautam, 2012). Estas tienen una historia de uso tradicional por su efecto culinario, así como su capacidad para prevenir y tratar enfermedades crónicas (Asowata *et al.*, 2016). Los alimentos vegetales pueden contribuir significativamente a la nutrición y salud humana, ya que contienen casi todos los nutrientes esenciales (Arzani *et al.*, 2007).

Desde la antigüedad, las plantas han desempeñado un papel importante en la civilización humana como componentes de alimentos, cosméticos, sabores, fragancias, medicamentos, entre otros (Seebaluck-Sandoram *et al.*, 2019). En la medicina tradicional se utilizan diferentes partes, como flores, frutos, hojas, raíces y tallos de plantas medicinales (Samrot *et al.*, 2018). Recientemente el interés científico se ha centrado en el potencial de salud de los fitoquímicos de los alimentos vegetales ya que las especies vegetales contienen una gran variedad de metabolitos secundarios comúnmente etiquetados como fitoquímicos. Se presume que la mayoría de los fitoquímicos naturales que se producen en los alimentos vegetales son seguros debido a un historial de consumo (Ikram *et al.*, 2015).

Existen una gran variedad de especies que son usadas regularmente por las personas en su comida tradicional y también se usan por su potencial fitoquímico para curar enfermedades. Una de ellas es el maíz integral que es rico en nutrientes y compuestos bioactivos que incluyen fibra, vitaminas, minerales y fitoquímicos, cada vez más evidencia

*Autor para correspondencia: Sugey López Martínez
 Correo-e: sugey.lopez@ujat.mx

Recibido: 27 de septiembre de 2022

Aceptado: 28 de agosto de 2023

Publicado: 12 de octubre de 2023

científica sugiere que el consumo regular de granos enteros reduce el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como diabetes tipo II, sobrepeso, obesidad y trastornos digestivos (Siyuan *et al.*, 2018).

La necesidad por saber cuáles son los componentes químicos principales de las plantas ayuda a entender su potencial culinario y medicinal. Existen tecnologías que permiten identificar la composición química de plantas, dentro de ellas se encuentra el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas que con su acoplamiento constituyen una herramienta importante para separar, identificar y cuantificar cualquier tipo de compuestos, sin embargo, la combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una tecnología de rutina, de las más conocidas y que la gran parte de investigadores utilizan (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Una de las tecnologías que ha tomado gran importancia para investigar las estructuras moleculares y cristalinas es la difracción de rayos X la cual es una tecnología que sirve para el estudio y análisis de materiales y permite identificar compuestos cristalinos, no obstante, hay pocos estudios con respecto a la composición química de las plantas (Bosch y Lara, 2010). Estudios previos como el de Martins y colaboradores (2011) y Lara (2010); López *et al.*, (2016) sugieren que esta técnica proporciona una identificación práctica de compuestos en el material, inclusive especies vegetales.

Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionaron cinco especies para este artículo, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Oreganon): *Eryngium foetidum* L (Perejil): *Coriandrum sativum* L (Cilantro): *Mentha spicata* L. (Hierba buena): *Ocimum basilicum* L (Albaca): cinco especies que encabezan la lista de las más utilizadas que provienen de una encuesta del grupo de investigación. Las cuales fueron recolectadas en las comunidades indígenas de Olcuatitán del municipio de Nacajuca, Tabasco utilizan en su vida cotidiana. Sin embargo, las comunidades utilizan su conocimiento empírico para el uso de las plantas, por lo cual el objetivo de este estudio es aportar conocimientos respecto al uso de la tecnología de difracción de rayos X y la aplicación de la misma para identificar compuestos químicos en las plantas y brindar una búsqueda exhaustiva de trabajos científicos previos a este, sobre el uso y composición de estas cinco especies a nivel internacional para que la sociedad obtenga información oportuna sobre los usos generales de estas especies, así como sus principales componentes bioactivos y de esta manera generar nuevos conocimientos a las comunidades rurales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se basó en los resultados que se obtuvieron en el estudio previo realizado por (López *et al.*, 2016) donde se utilizó la misma técnica de difracción de rayos X.

Búsqueda de información

Se realizó una revisión de la literatura investigando en bases de datos científicas de los años 2007 al 2017 aunque hay

algunos artículos que se consideraron interesantes de otros años que incluyen, las bases de datos fueron ScienceDirect, Scopus, Springer, Taylor y Francis Online, Wiley, para estudios centrados en lo fitoquímico y actividades farmacológicas de las cinco especies

Recolección de muestras

En el verano del 2019 se recolectaron muestras representativas de las cinco especies *Eryngium foetidum* L (Perejil): *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Oreganon): *Mentha spicata* L. (Hierba buena): *Coriandrum sativum* L (Cilantro): (*Ocimum basilicum* L (Albaca) (individuos completos, raíces y plantas) provenientes de los huertos familiares, tres individuos de cada especie de diez hogares seleccionados al azar en la comunidad de Olcuatitán, Nacajuca, Tabasco, con coordenadas 18° 11' 25.620" N, 92° 57' 40.104" W, lo cual posteriormente se procesaron en el laboratorio de suelos de la UJAT, División Académica de Ciencias Biológicas.

Pretratamiento de muestras

Las muestras se secaron en un horno a 90 °C por 72 h (Otazu *et al.*, 2010); posteriormente los materiales secos se pulverizaron, guardaron en tubos eppendorf de 50 mL etiquetados y se trasladaron en bolsas plásticas resellables para su análisis en el laboratorio de química de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Tratamiento de muestras (Difracción de rayos X)

Las caracterizaciones de los componentes de la muestra se efectuaron en el laboratorio de química de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa con el apoyo del Dr. Víctor Hugo Lara Corona y el M. en E. Ignacio López y Celis, se realizaron en un Difractómetro de rayos X (SIEMENS D500). Las muestras se montaron individualmente sobre un portaobjetos de vidrio ranurado que se usó como soporte de la muestra. El difractómetro estuvo conectado a un ordenador para el análisis de datos y la determinación de fases utilizando el programa Diffract AT (versión 3.2, Livermore, CA, Estados Unidos de América, 1995-2000). Este equipo consistía en un porta muestras de dióxido de silicio (SiO₂): un tubo de Cu, un monocromador de has difractado y un detector de centelleo se analizaron las características del patrón de difracción los cuales se presentan en gráficos.

RESULTADOS

Revisión bibliográfica

El consumo de plantas medicinales ha ido en aumento en los últimos años en todo el mundo y es frecuente su empleo en combinación con medicamentos prescritos por los médicos, por ello se realizó una búsqueda exhaustiva en donde se identificaron los usos en la medicina tradicional y uso culinario de las cinco especies los cuales se observan en la Tabla 1. Los principales componentes químicos o bioactivos de cada especie, arrojados en estudios previos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Usos medicinales y culinarios de cada especie vegetal
Table 1. Medicinal and culinary uses of each plant species.

Especie	Nombre común	Usos	Referencia
<i>Ocimum basilicum</i> L.	<p>Albahaca</p> 	<p>Antidiabético Cicatrización de heridas Antioxidante Antiinflamatorio Actividades antiestrés y anticancerígenas Para agregar un sabor distintivo en la comida.</p>	(Singh <i>et al.</i> , 2018).
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<p>Cilantro</p> 	<p>Se usa comúnmente en la gastronomía mundial. Importante valor medicinal. Es una gran fuente de compuestos bioactivos para el descubrimiento de nuevos fármacos.</p>	(Prachayasittikul <i>et al.</i> , 2018)
<i>Mentha spicata</i> L.	<p>Hierbabuena</p> 	<p>Se usan actualmente como saborizantes para bebidas y preparaciones alimenticias. En la medicina popular para el tratamiento de bronquitis, náuseas, flatulencia, anorexia, afecciones hepáticas, analgésico.</p>	(Mahboubi, 2018).
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	<p>Oreganón</p> 	<p>Como ingredientes aromático y saborizante o en la preparación de alimentos. Para el tratamiento de los trastornos respiratorios como el asma, enfermedades como la dispepsia y diarrea. Antioxidante. Antiinflamatorios y quimioterapéuticos</p>	(Shubha y Bhatt, 2015)
<i>Eryngium foetidum</i> L.	<p>Perejil Ranchero</p> 	<p>Usada ampliamente para condimentar alimentos. Usada en la etnomedicina para el tratamiento de una serie de dolencias como fiebres, vómitos, quemaduras, hipertensión, dolor de cabeza, asma, artritis, mordeduras de serpientes, diarrea. Antiinflamatorio, analgésico, actividad anticonvulsiva, clastogénica, anticancerígena, antidiabética y antibacteriana.</p>	(Singh <i>et al.</i> , 2014).

Tabla 2. Principales componentes químicos y bioactivos en cinco especies vegetales
Table 2. Chemical and bioactive principal constituents in five plant species.

Especie	Principales componentes químicos / Bioactivos	Metodología	Referencia
<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Cariofileno α-cubebene	Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación y se analizaron por GC-MS	(Ismail, 2006)
	α-terpineol	GC/MS	(Politeo <i>et al.</i> , 2007)
	Linalool, α-cadinol, γ-cadineno	GC/MS	(Hussain <i>et al.</i> , 2008)
	Éster metílico del ácido cinámico, Ciclohexeno	GC/MS	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
	β-elemeno, Alcanfor	GC/MS	(Kathirvel y Ravi, 2012)
	Acetato de linalilo, Elemol, Mirceno, Ocimeno	GC/MS	(Hadj <i>et al.</i> , 2012)
	Beta-Caryophyllene, Alcanfor	GC/MS	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2013)
	Metil eugenol, Metil chavicol	GC/MS	(Joshi, 2014)
	Geranial	GC/MS	(Shirazi <i>et al.</i> , 2014)
	P-alilansole, Acetato de nerilo	GC/MS	(Al Abbasy <i>et al.</i> , 2015)
	β-bisabolene Germacrene D	Análisis por GC-FID	(Beatovic <i>et al.</i> , 2015)
	Metil cinamato, α-farnesene	GC/MS	(El-Soud <i>et al.</i> , 2015)
	Limoneno	GC/MS	(Zlotek <i>et al.</i> , 2016)
	1,8-cineol, Eugenol, α-bergamotene	GC/MS	(Varga <i>et al.</i> , 2017)
α-trans-bergamotene, Eucalyptol, Gamma-cadinene	GC/MS	(Baldim <i>et al.</i> , 2018)	
<i>Coriandrum sativum</i> L.	γ-terpinene	Los análisis se realizaron por GC e IR.	(Bandoni <i>et al.</i> , 1998)
	Alcanfor	GC/MS	(De Figueiredo <i>et al.</i> , 2004)
	Geraniol, 2-decenal	Los análisis se realizaron por HPLC.	(Oganesyan <i>et al.</i> , 2007)
	Apigenina, Luteolina, Hiperósido, Hesperidina, Vicenina, Diosmina	GC/MS	(Bhuiyan <i>et al.</i> , 2009)
	Ácido 2-decenoico, Ácido E-11-tetradecenoico, Ácido cáprico, Alcohol undecílico, Ácido tridecanoico, Ácido undecanoico	GC/MS	(Matasyoh <i>et al.</i> , 2009)
	Decanal, Aldehídos, Alcoholes	GC/MS	(Zoubir y Baaliouamer, 2010)
	Linalol	GC-FID y (GC/MS)	(Anwar <i>et al.</i> , 2011)
	Acetato de geranilo, Anetol, P-cimeno	GC/MS	(Orav <i>et al.</i> , 2011)
	Alcanfor, α-pineno	GC/MS	(Chung <i>et al.</i> , 2012)
	Ciclododecanol, 1-decanol, Fitol	GC/MS	(Sriti <i>et al.</i> , 2012)
	γ-terpino, P- cimeno	GC/MS	(Caputo <i>et al.</i> , 2016)
	α-pineno, P- quimene	GC/MS	(Yildiz, 2016)
	Dodecanal, Tetradecenal	GC/MS	(Beyzi <i>et al.</i> , 2017)
	Limoneno, P-cimeno, Gamma-terpinene, Terpinen-4-ol, Alfa-terpineol, Acetato de geranilo		

Especie	Principales componentes químicos / Bioactivos	Metodología	Referencia
<i>Mentha spicata</i> L.	Pulegona, Carvona	GC/MS	(Telci <i>et al.</i> , 2004)
	1,8-cineol, Carvona	GC/MS	(Chauhan <i>et al.</i> , 2009)
	Cis-dihidrocarvona, Acetato de carvilo	GC/MS	(Hussain <i>et al.</i> , 2010)
	β -cariofilina, β -bourbonene, α -terpineol, Terpinen-4-ol	GC/MS	(Boukhebt <i>et al.</i> , 2011)
	Trans-carveol	GC/MS	(Znini <i>et al.</i> , 2011)
	β -cariofileno, Trans-dihidrocarvone	GC/MS	(Şarer <i>et al.</i> , 2011)
	Cis-carveol, Limoneno	GC/MS	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2012)
	Dihidrocarvona, Canfeno	GC/MS	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
	Limoneno, Muuroleno, Mirceno	GC/MS	(Scherer <i>et al.</i> , 2013)
	L-menthone, Pulegona	GC/MS	(Dhifi <i>et al.</i> , 2013)
	Carvona	GC/MS	(Kedia <i>et al.</i> , 2014)
	Piperitona	Se analizaron GC/MS	(Teixeira <i>et al.</i> , 2014)
	Cis-dihidrocarveol, Trans-cariofileno, Mentona, Mentol	GC/MS	(Shahbazi, 2015)
	Germacreno D, β -pineno, β -cariofileno	GC/MS	(Chrysargyris <i>et al.</i> , 2017)
Cis-dihidrocarvona, Germacreno D	GC/MS	(Bardaweel <i>et al.</i> , 2018)	
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	Carvacrol, Undecanal, ρ -cimeno, Óxido de cariofileno, β -selinene	Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación y se analizaron por GC-MS.	(Senthilkumar y Venkatesalu, 2010)
	Timol, γ -terpinene, β -cariofileno	GC/MS	(Da Costa <i>et al.</i> , 2010)
	α -humuleno, Undecanal, γ -terpino	GC/MS	(Annadurai y Venugopalan, 2010)
	Alcaloides, Carbohidratos, Glucósidos, Proteínas, Aminoácidos, Flavonoides	GC/MS	(Patel <i>et al.</i> , 2010)
	Ácido cafeico, Ácido rosmarínico, Ácido cumarico, Luteolina, Quercitina, Eriodyctiol	Se identificaron mediante el análisis UPLC-MS	(El-hawary <i>et al.</i> , 2012)
	Alcanfor, O-cymene, α -terpinene	GC/MS	(Hassani <i>et al.</i> , 2012)
	3-carene	GC/MS	(Erny <i>et al.</i> , 2012)
	Linalool, Acetato de Nerol, Acetato de geranilo	GC/MS	(Asimwe <i>et al.</i> , 2014)
Carvacrol	Se analizaron por GC-FID y GC/MS.	(Pinheiro <i>et al.</i> , 2015)	
<i>Eryngium foetidum</i> L.	2-dodecenal, Ácido dodecanoico	GC/MS	(Leclercq <i>et al.</i> , 1992)
	Aldehídos aromáticos, Aldehídos terpénicos	GC/MS y H-NMR	(Wong <i>et al.</i> , 1994)
	Ácido hexadecanoico, Carotol	GC/MS	(Pino <i>et al.</i> , 1997)
	2,3,6-trimetilbenzaldehído, 2-tetradecenal	GC/MS	(Martins <i>et al.</i> , 2003)
	3-dodecenal, γ -terpinene	GC/MS	(Cardozo <i>et al.</i> , 2004)
	Ácido dodecanoico, Duraldehído	GC/MS	(Chowdhury <i>et al.</i> , 2007)
	5-dodecene, Trimetilfenol	Se analizaron por GC-FID y GC/MS.	(Jaramillo <i>et al.</i> , 2011)
	Carotenoides, Fenólicos, Antroquinonas	Los análisis se realizaron por HPLC	(Singh <i>et al.</i> , 2013)
	Tetradecenal, α -pineno	Los análisis se realizaron por HPLC	(Aswathy y Saj, 2014)
	Muurola-4,10, Ácido palmítico, Fitol, α -cadinol	GC/MS	(Chandrika <i>et al.</i> , 2015)
	Tetradecenal, 2,4,5-trimetoxibenzaldehído	GC/MS	(Thomas <i>et al.</i> , 2017)

GC-MS (Cromatografía de gases / espectrometría de masas). HPLC (cromatografía líquida). GC-FID (cromatografía de gases-detector de ionización de llama). H-NMR (resonancia magnética nuclear de protones). UPLC-MS (cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas). GC (Cromatografía de gases). IR (espectroscopia infrarroja).

Identificación de compuestos fitoquímicos en las plantas, a través de difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos x permitió encontrar compuestos no identificados en todas las especies que se analizaron. La Figura 1 muestra el patrón de difracción de rayos x y la identificación de un compuesto que no había sido reportado para la especie *Plectranthus amboinicus* se puede observar en el espectro con color verde: el pirazol que es un compuesto heterocíclico y representante de los más activos, el cual tiene actividades como antimicrobianos (Malladi *et al.*, 2012) y analgésicos (Vijesh *et al.*, 2013).

La Figura 2 muestra la identificación de tres compuestos no identificados para la especie *Mentha spicata* L. en el espectro la línea en color negro: ácido perclórico de celulosa que es un polímero biodegradable, un catalizador novedoso y económico, sirve como un soporte único para la síntesis de catalizadores ácidos solidos que se ha utilizado en diversas transformaciones orgánicas (Khan y Siddiqui, 2014); de igual forma la línea de color azul representa el $C_{25}H_{52}$ n-pentacosano que es un hidrocarburo alifático saturado constituyente de muchas ceras naturales, un sólido incoloro en condiciones ambientales y la línea de color verde $C_{10}H_{12}ClNO_4$ Carbamato de Clorfenesina que es un relajante muscular esquelético utilizado para el tratamiento del dolor asociado con el esqueleto trauma muscular (distensiones, esguinces): inflamación y espasmos u otras afecciones musculares (Stanko, 1990; Yu *et al.*, 2009).

La Figura 3 muestra la identificación de dos compuestos no identificados para las especies *Ocimum basilicum* L. en el espectro la línea color negro, *Coriandrum sativum* L. la línea verde y *Eryngium foetidum* L. en espectro azul: celulosa que es la molécula biológica orgánica más abundante, ya que

constituye la pared celular de las células vegetales, es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. Es el carbohidrato más abundante disponible en la naturaleza, actualmente se utilizan recursos celulósicos en productos tales como madera, combustible, textiles, papel y plásticos (Imai *et al.*, 2004) y n Poli (trimetilcelulosa) del cual no se encontró dato alguno. La detección de estos compuestos deja en evidencia las propiedades medicinales de estas especies.

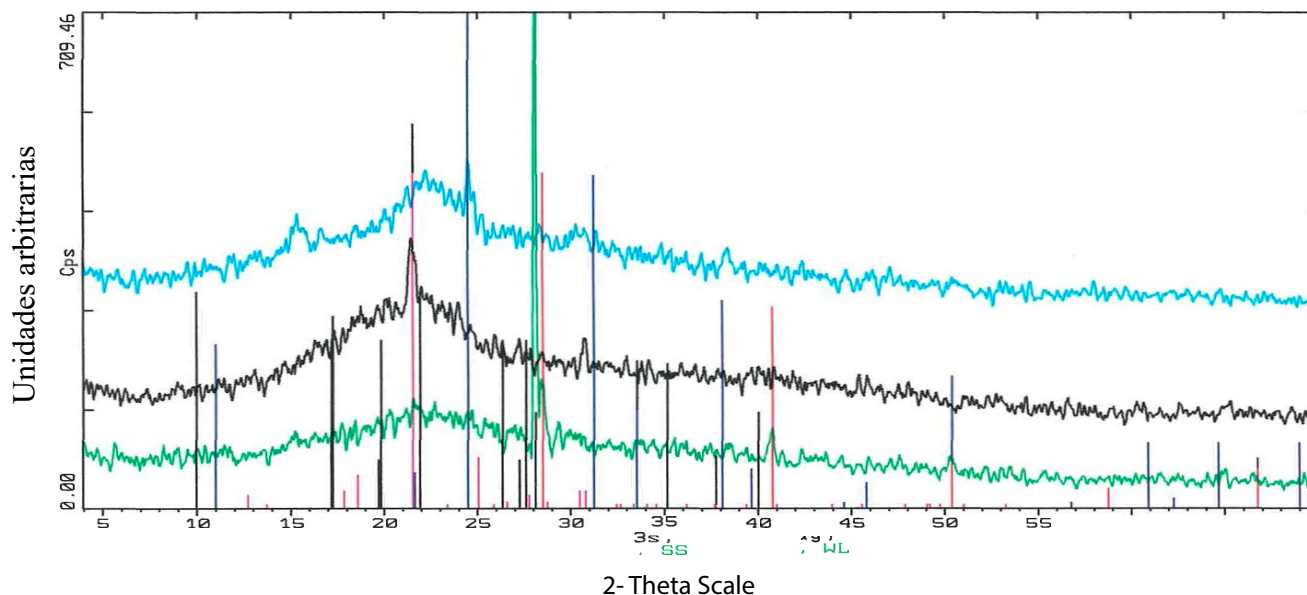
DISCUSIÓN

Actualmente las plantas son importantes en la cocina y medicina tradicional, ya que como se apreció en la Tabla 1 las personas las utilizan de diferentes maneras como para el tratamiento de varias enfermedades y dolencias, como agentes saborizantes o ingredientes corporativos en la preparación de alimentos y de igual forma son una gran fuente de compuestos bioactivos para el descubrimiento de nuevos fármacos, por lo que saber cuáles son los componentes químicos principales de las plantas ayuda a entender su potencial culinario y medicinal.

En la Tabla 2 la gran cantidad de componentes bioactivos con los que cuenta la planta siendo el linalool el compuesto más abundante en la albahaca, el limoneno más abundante en el cilantro, la carvona en la hierbabuena, el carvacrol en el oreganón y el 2- dodecenal en el perejil, siendo estos compuestos quienes le dan su olor, sabor característico a las mismas, por otra parte también se aprecian las diferentes técnicas que se utiliza para identificar estos compuestos como por ejemplo espectroscopia infrarroja, cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas, cromatografía de gases, espectrometría de masas, siendo esta ultima la téc-

Figura 1. Difractograma de la composición química de las hojas de *Plectranthus amboinicus* (Lour Spreng). Nombre común oreganón compuesto registrado en rosa: $C_3H_4N_2$ Pirazol en azul.

Figure 1. Difractogram of the chemical composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour Spreng) leaves. Common name oreganon compound recorded in pink: $C_3H_4N_2$ Pyrazole in blue.



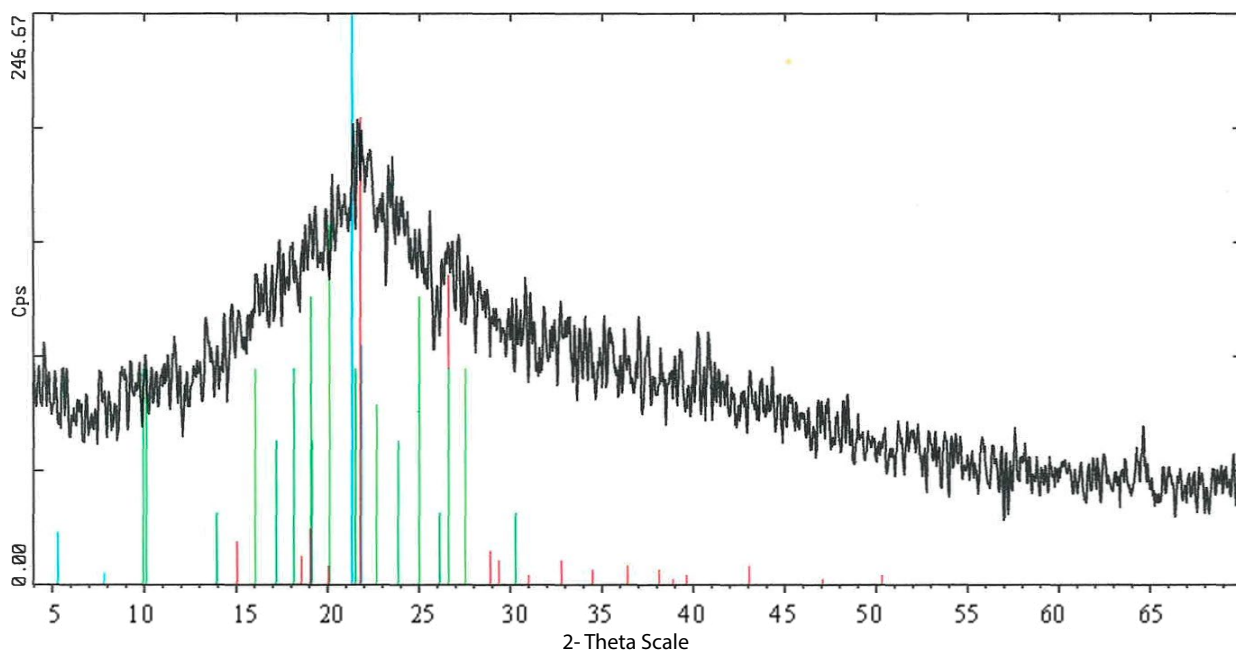


Figura 2. Difractograma de la composición química de las hojas de *Mentha spicata* L. nombre común hierbabuena. Se encontraron los siguientes compuestos: $(C_{12}H_{24}O_{12} \cdot HClO_4)$ ácido perclórico de celulosa en azul; $C_{25}H_{52}$ n-pentacosano en rosa; $C_{10}H_{12}ClN_4O_4$ Carbamato de clorfenesina en verde.
Figure 2. Diffractogram of the chemical composition of the leaves of *Mentha spicata* L. common name peppermint. The following compounds were found: $(C_{12}H_{24}O_{12} \cdot HClO_4)$ cellulose perchloric acid in blue; $C_{25}H_{52}$ n-pentacosane in pink; $C_{10}H_{12}ClN_4O_4$ chlorphenesin carbamate in green.

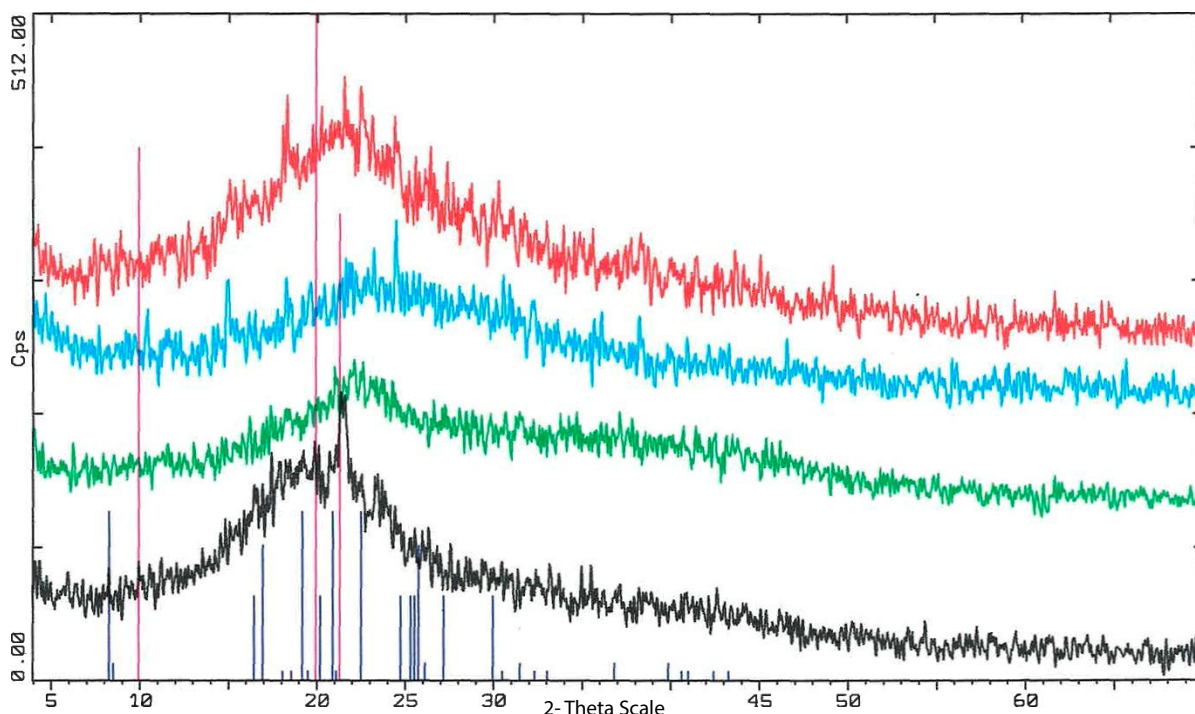


Figura 3. Difractograma de la composición química de las hojas de *Ocimum basilicum* L. nombre común Albahaca. *Coriandrum sativum* L. nombre común cilantro y *Eryngium foetidum* L. nombre común perejil. Se encontraron los siguientes compuestos: $(C_6H_{10}O_5)$ Celulosa en rosa; $(C_{10}H_{16}O_5)$ y n Poli(trimetilcelulosa) en azul.
Figure 3. Diffractogram of the chemical composition of the leaves of *Ocimum basilicum* L. common name Basil. *Coriandrum sativum* L. common name coriander and *Eryngium foetidum* L. common name parsley. The following compounds were found: $(C_6H_{10}O_5)$ Cellulose in pink; $(C_{10}H_{16}O_5)$ and n Poly(trimethylcellulose) in blue.

nica más utilizada para análisis fitoquímico, resaltando que la técnica de difracción de rayos X es muy poco conocida y utilizada pero es una técnica viable, rápida y novedosa para identificar compuestos químicos como menciona Martins *et al.*, (2011): ya que mostro cinco compuestos que no habían sido reportados utilizando estas tecnologías comunes.

El pirazole ($C_3H_4N_2$) es un heterociclo aromático que contiene dos átomos de nitrógeno en sus anillos de cinco miembros (Kiyani *et al.*, 2015) constituye una importante familia heterocíclica que cubre una amplia gama de productos sintéticos y naturales que exhiben innumerables propiedades químicas, biológicas, agroquímicas y farmacológicas (Lv *et al.*, 2010).

Ácido perclórico de celulosa ($C_{12}H_{24}O_{12} \cdot HClO_4$) es un catalizador novedoso, económico y fácilmente preparable que sirve como un soporte único para la síntesis de catalizadores ácidos sólidos que se ha utilizado en diversas transformaciones orgánicas. n-pentacosano ($C_{25}H_{52}$) es un alcano que consiste en una cadena no ramificada de 25 átomos de carbono, son copos esponjosos relucientes blancos, insoluble en agua, Tiene un papel como semioquímico y metabolito vegetal, constituyente de muchas ceras naturales.

Carbamato de clorfenesina ($C_{10}H_{12}ClNO_4$) es un relajante del músculo esquelético utilizado para el tratamiento del dolor asociado con esquelético traumatismo muscular (distensiones, esguinces): inflamación y espasmos u otras afecciones musculares (Stanko, 1990) funciona como un bloqueador selectivo de las vías polisinápticas en la columna niveles supraespinales (Kurachi y Aihara, 1990).

Celulosa ($C_6H_{10}O_5$) es el polímero orgánico más común y se considera una fuente casi inagotable de materia prima para la creciente demanda de productos ecológicos y biocompatibles (Klemm *et al.*, 2002): para el último compuesto n-Poli(trimetilcelulosa) ($C_{10}H_{16}O_5$) no se encontró información, solo se conoce que la metilcelulosa se ha utilizado como laxante.

Por otro lado, Subramanian *et al.* (2012) menciona que la variación la composición química de cada planta puede variar desde las estructuras botánica que se analicen, así como en la composición mineral del suelo en el que se cultivan las plantas. Por lo que la identificación de estos compuestos se puede deber a la capacidad de absorción preferencial de la planta, el uso de fertilizantes, el agua de riego y las condiciones climáticas.

Los resultados muestran que las plantas medicinales y culinarias examinadas desempeñan un papel importante en las comunidades indígenas, ya que cuentan con una gran fuente de compuestos químicos y bioactivos que favorecen a la nutrición humana, además de su importante valor medicinal y culinario. La principal contribución de este trabajo es el desarrollo de un nuevo método de identificación de compuestos químicos para complementar los ya utilizados en la actualidad para ampliar la investigación de estas especies de plantas y distribuir la información que se encuentra en artículos científicos a trípticos informativos útiles para las comunidades. Los resultados concuerdan con los de (López *et al.*,

2016) quienes mencionaron que el método DRX puede ser un complemento útil en la caracterización química de especies vegetales que son importantes en la medicina tradicional. De hecho, alienta el estudio de la cristalografía de difracción de rayos X como una herramienta de análisis fitoquímico para la identificación y cuantificación de compuestos en productos vegetales, que complementan la identificación de compuestos por HPLC (Cromatografía líquida) y RMN (Espectroscopia de resonancia magnética nuclear).

CONCLUSIONES

En esta investigación la técnica de difracción de rayos X solo se utilizó para la identificación de compuestos y no para la cuantificación, esta técnica permitió encontrar compuestos no identificados en todas las especies que se analizaron, para la especie *P. amboinicus* se identificó un compuesto siendo el pirazol, la especie *M. spicata* en total de tres compuestos: Celulosa ácido perclórico, n-pentacosano y Clorfenesina carbamato, por último las especies *O. basilicum*, *C. sativum* y *E. foetidum* mostraron la presencia de dos compuestos, Celulosa y n-Poli(trimetilcelulosa): los cuales algunos compuestos son utilizados para un amplio espectro de fármacos y utilizados como relajante muscular teniendo propiedades antiinflamatorias y analgésicas, por lo que se entiende las propiedades medicinales de las plantas, esta información reunida en la presente investigación se otorgó al cuerpo de investigación los cuales realizaron trípticos de difusión sobre las plantas estudiadas a las comunidades de Olcuatitán del municipio de Nacajuca, Tabasco.

REFERENCIAS

- Al Abbasy, D. W., Pathare, N., Al-Sabahi, J. N., y Khan, S. A. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 5: 645-649. [https://doi.org/10.1016/s2222-1808\(15\)60905-7](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(15)60905-7).
- Annadurai, S., y Venugopalan, V. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. Parasitology Research. 107: 1275-1278. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1996-6>
- Anwar, F., Sulman, M., Hussain, A. I., Saari, N., Iqbal, S., y Rashid, U. 2011. Physicochemical composition of hydro-distilled essential oil from coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds cultivated in Pakistan. Journal of Medicinal Plants Research. 5: 3537-3544.
- Arzani, A., Zeinali, H., y Razmjo, K. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha* spp). Plant Physiology and Biochemistry. 45: 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.03.023>
- Asiimwe, S., Borg-Karlsson, A. K., Azeem, M., Mugisha, K. M., Namutebi, A., y Gakunga, N. J. 2014. Chemical composition and Toxicological evaluation of the aqueous leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. 3: 19-27.
- Asowata-Ayodele, A. M., Afolayan, A. J., y Otunola, G. A. 2016. Ethnobotanical survey of culinary herbs and spices used in the traditional medicinal system of Nkonkobe Municipality,

- Eastern Cape, South Africa. *South African Journal of Botany*, 104, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.01.001>
- Aswathy, P. M., y Saj, O. P. 2014. Carminative, phytochemical and antioxidant potentialities of the leaf extracts of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 2269-2280.
- Baldim, J. L., Silveira, J. G. F., Almeida, A. P., Carvalho, P. L. N., Rosa, W., Schripsema, J. y Luiz, J. H. H. 2018. The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products*. 112: 821-829. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.016>.
- Bandoni, A. L., Mizrahi, I., y Juárez, M. A. 1998. Composition and quality of the essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.) from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*. 10: 581-584. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700977>.
- Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A., y Flamini, G. 2018. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18: 201. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2274-x>.
- Beatovic, D., Krstic-Milosevic, D., Trifunovic, S., Siljegovic, J., Glamoclija, J., Ristic, M., y Jelacic, S. 2015. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. *Records of Natural Products*. 9: 62. <https://doi.org/10.2298/hemind120615086b>.
- Beyzi, E., Karaman, K., Gunes, A., y Beyzi, S. B. 2017. Change in some biochemical and bioactive properties and essential oil composition of coriander seed (*Coriandrum sativum* L.) varieties from Turkey. *Industrial Crops and Products*. 109: 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.008>.
- Bhuiyan, M. N. I., Begum, J., y Sultana, M. 2009. Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 4: 150-153. <https://doi.org/10.3329/bjp.v4i2.2800>
- Bosch Giral, P., y Lara Corona, V. H. 2014. Difracción y fluorescencia de rayos X. México: Terracota.
- Boukhebt, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., y Harzallah, D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*. 3: 267-275. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i4.6>.
- Caputo, L., Souza, L. F., Alloisio, S., Cornara, L., y De Feo, V. 2016. *Coriandrum sativum* and *Lavandula angustifolia* essential oils: chemical composition and activity on central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1999. <https://doi.org/10.3390/ijms17121999>.
- Cardozo, E., Rubio, M., Rojas, L. B., y Usubillaga, A. 2004. Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*. 16: 33-34. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698645>.
- Chandrika, R., Saraswathi, K. T., y Mallavarapu, G. R. 2015. Constituents of the essential oils of the leaf and root of *Eryngium foetidum* L. from two locations in India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18: 349-358. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2014.960277>.
- Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G., y Tawa, A. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products*. 29: 654-656. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.003>.
- Chowdhury, J. U., Nandi, N. C., y Yusuf, M. 2007. Chemical Constituents of essential oil of the leaves of *Eryngium foetidum* from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*. 42: 347-352. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v42i3.674>.
- Chrysargyris, A., Xylia, P., Botsaris, G., y Tzortzakakis, N. 2017. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*. 103: 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.010>.
- Chung, I. M., Ahmad, A., Kim, S. J., Naik, P. M., y Nagella, P. 2012. Composition of the essential oil constituents from leaves and stems of Korean *Coriandrum sativum* and their immunotoxicity activity on the *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 34: 152-156. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.589030>.
- Da Costa, J. G., Pereira, C. K., Rodrigues, F. F., y de Lima, S. G. 2010. Chemical Composition, Antibacterial and Fungicidal Activities of Leaf Oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Journal of Essential Oil Research*. 22: 183-185. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700298>.
- De Figueiredo, R. O., Marques, M. O. M., Nakagawa, J., y Ming, L. C. 2004. Composition of Coriander essential oil from Brazil. *Acta Horticulturae*. 1:135-138. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2004.629.18>.
- Dhifi, W., Jelali, N., Mnif, W., Litaïem, M., y Hamdi, N. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and its biological activities. *Journal of Food Biochemistry*. 37: 362-368. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00656.x>.
- El-hawary, S. S., El-sofany, R. H., Abdel-Monem, A. R., Ashour, R. S., y Sleem, A. A. 2012. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spring growing in Egypt (Lamiaceae). *Pharmacognosy Journal*. 4: 45-54. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.32.9>.
- El-Soud, N. H. A., Deabes, M., El-Kassem, L. A., y Khalil, M. 2015. Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 3: 374. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2015.082>.
- Erny Sabrina, M. N., Razali, M., Mirfat, A. H. S., y Mohd Shukri, M. A. 2014. Antimicrobial activity and bioactive evaluation of *Plectranthus amboinicus* essential oil. *American Journal of Research Communication*. 2: 121-127.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M., y Yogalakshmi, K. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology research*. 110: 2023-2032. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2731-7>.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., y Yogalakshmi, K. 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental parasitology*. 134: 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.018>.

- Gutiérrez, MC: Droguet, M." La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín Intexter, julio 2002, núm. 122, p. 35-41. <https://doi.org/10.18259/acs.2014033>.
- Hadj Khelifa, L., Brada, M., Brahmi, F., Achour, D., Fauconnier, M. L., y Lognay, G. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of *Ocimum basilicum* leaves from the northern region of Algeria. *Topclass Journal of Herbal Medicine*. 1: 53-58. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2011.10644009>.
- Hassani, M. S., Zainati, I., Zrira, S., Mahdi, S., y Oukessou, M. 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spring. Essential Oil from Archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 15: 637-644. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2012.10644098>.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., y Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108: 986-995. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010>.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., y Przybylski, R. 2010. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistán. *Journal of Essential Oil Research*. 22: 78-84. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700269>.
- Ikram, E. H. K., Stanley, R., Netzel, M., y Fanning, K. 2015. Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 41: 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.02.010>.
- Imai, M., Ikari, K., y Suzuki, I. 2004. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*. 17: 79-83. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(03)00141-4).
- Ismail, M. 2006. Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum*. essential oil. *Pharmaceutical biology*. 44: 619-626. <https://doi.org/10.1080/13880200600897544>.
- Jaramillo, B. E., Duarte, E., y Martelo, I. 2011. Volatile chemical composition of the essential oil from Colombian *Eryngium foetidum* L. and determination of its antioxidant activity. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16: 140-150.
- Joshi, R. K. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) from Western Ghats of Northwest Karnataka, India. *Ancient science of life*. 33: 151. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.144618>.
- Kathirvel, P., y Ravi, S. 2012. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and Hep-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research*, 26: 1112-1118. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.545357>.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C. S., y Dubey, N. K. 2014. Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration y Biodegradación*, 89: 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.027>.
- Khan, T., y Siddiqui, Z. N. 2014. Perchloric acid modified-cellulose: a versatile, novel, and biodegradable heterogeneous solid acid catalyst for single-pot synthesis of novel bis-pyran annulated heterocyclic scaffolds under solvent-free conditions. *New Journal of Chemistry*. 38: 4847-4858. <https://doi.org/10.1039/c4nj00529e>.
- Kiyani, H., Albooyeh, F., y Fallahnezhad, S. 2015. Synthesis of new pyrazolyl-1, 3-diazabicyclo [3.1. 0] hexe-3-ene derivatives. *Journal of Molecular Structure*. 1091: 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.02.069>.
- Klemm, D., Schmauder, HP, Heinze, T. y Cellulose, I. 2002. Biopolímeros. De Baets, S. 1:275-319.
- Kurachi, M., y Aihara, H. 1984. Effect of a muscle relaxant, chlorphenesin carbamate, on the spinal neurons of rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 36: 7-13. <https://doi.org/10.1254/jjp.36.7>.
- Leclercq, P. A., Duñg, N. X., Lô, V. N., y Toanh, N. V. 1992. Composition of the essential oil of *Eryngium foetidum* L. from Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*. 4: 423-424. <https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698097>.
- Liu, K. H., Zhu, Q., Zhang, J. J., Xu, J. F., y Wang, X. C. 2012. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Mentha spicata* Lamiaceae. In *Advanced Materials Research*. 524:2269-2272. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.524-527.2269>.
- López-Martínez, S., López y Celis, I., Lara Corona, V. H., y Velásquez Martínez, J. R. 2016. Chemical composition of the leaves rodoe discolors using x-ray diffraction spectroscopy. *SYLWAN journal*. 1:148-160.
- Lv, P. C., Sun, J., Luo, Y., Yang, Y., y Zhu, H. L. 2010. Design, synthesis, and structure-activity relationships of pyrazole derivatives as potential FabH inhibitors. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*. 20: 4657-4660. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.105>.
- Mahboubi, M. 2021. *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 11: 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2017.08.011>.
- Malladi, S., Isloor, A. M., Peethambar, S.K., Ganesh, B.M., y Goud, P. S. 2012. Synthesis and antimicrobial activity of some new pyrazole containing cyanopyridone derivatives. *Der Pharma Chemica*. 4: 43-52.
- Martins, A.P., Salgueiro, L.R., da Cunha, A.P., Vila, R., Cañigüeral, S., Tomi, F., y Casanova, J. 2003. Essential oil composition of *Eryngium foetidum* from S. Tome e Principe. *Journal of essential oil research*. 15: 93-95. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712077>.
- Martins, F. T., dos Santos, M. H., Coelho, C. P., Barbosa, L. C., Dias, G. C., Fracca, M. P., ... y Doriguetto, A. C. 2011. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 54: 451-457. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.010>.
- Matasyoh, J.C., Maiyo, Z. C., Ngure, R.M., y Chepkorir, R. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*. 113: 526-529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.097>.
- Oganesyan, E.T., Nersesyan, Z. M., y Parkhomenko, A. Y. 2007. Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41: 149-153. <https://doi.org/10.1007/s11094-007-0033-2>.
- Otazu-Larrasoana, 2010. Influencia de la temperatura y tiempo desecado en la calidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* DC staf. Undergraduate dissertation. Universidad Viosa Minas Gerai s– Brasil.

- Patel, R., Mahobia, N., Waseem, N., Upwar, N., y Singh, S. 2010. Phyto-physicochemical investigation of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *Pharmacognosy Journal*. 2: 536-542. [https://doi.org/10.1016/s0975-3575\(10\)80057-4](https://doi.org/10.1016/s0975-3575(10)80057-4).
- Pinheiro, P. F., Costa, A. V., Alves, T. D. A., Galter, I. N., Pinheiro, C. A., Pereira, A. F., ... y Fontes, M. M. P. 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 8981-8990. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03049>.
- Pino, J. A., Rosado, A., y Fuentes, V. 1997. Composition of the leaf oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 9: 467-468. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700751>.
- Politeo, O., Jukic, M., y Milos, M. 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*. 101: 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.045>.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., y Prachayasittikul, V. 2018. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. *Food Research International*. 105: 305-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.019>.
- Gautam, P. L. 2012. Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement Series: Medicinal Plant. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 6: 102-112.
- Samrot, A. V., Raji, P., Selvarani, A. J., y Nishanthini, P. 2018. Antibacterial activity of some edible fruits and its green synthesized silver nanoparticles against uropathogen-*Pseudomonas aeruginosa* SU 18. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16: 253-270. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.014>.
- Şarer, E., Toprak, S. Y., Otlu, B., y Durmaz, R. 2011. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Mentha spicata* L. subsp. *spicata*. *Journal of Essential Oil Research*. 23: 105-108. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700435>.
- Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L., y da Silva, A. G. 2013. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*. 50: 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.007>.
- Seebaluck-Sandoram, R., Lall, N., Fibrich, B., van Staden, A. B., Saleem, H., y Mahomoodally, M. F. 2019. Antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic evaluation of two underutilized food plants: *Averrhoa bilimbi* L. (Oxalidaceae) and *Phyllanthus acidus* L. Skeels (Phyllanthaceae). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 18: 100998. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.036>.
- Senthilkumar, A., y Venkatesalu, V. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitology Research*. 107: 1275-1278. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1996-6>.
- Shahbazi, Y. 2015. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *Journal of Pathogens*. 1:1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/916305>.
- Shirazi, M. T., Gholami, H., Kavooosi, G., Rowshan, V., y Tafsiroy, A. 2014. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science y Nutrition*. 2: 146-155. <https://doi.org/10.1002/fsn3.85>.
- Shubha, J. R., y Bhatt, P. 2015. *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 166: 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.055>.
- Singh, B. K., Ramakrishna, Y., y Ngachan, S. V. 2014. Spiny coriander (*Eryngium foetidum* L.): a commonly used, neglected spicing-culinary herb of Mizoram, India. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 61: 1085-1090. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0130-5>.
- Singh, D., y Chaudhuri, P. K. (2018). A review on phytochemical and pharmacological properties of Holy basil (*Ocimum sanctum* L.). *Industrial Crops and Products*. 118: 367-382. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.048>.
- Singh, S., Singh, D. R., Banu, S., y Salim, K. M. 2013. Determination of bioactive and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: a traditional culinary and medicinal herb. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 83: 453-460. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0141-y>.
- Siyuan, S., Tong, L., y Liu, R. 2018. Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 7: 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.003>.
- Sriti, J., Msaada, K., Talou, T., Faye, M., Vilarem, G., y Marzouk, B. 2012. Coupled extruder-headspace, a new method for analysis of the essential oil components of *Coriandrum sativum* fruits. *Food Chemistry*. 134: 2419-2423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.029>.
- Stanko, J. R. 1990. A review of oral skeletal muscle relaxants for the craniomandibular disorder (CMD) practitioner. *CRANIO*. 8: 234-243. <https://doi.org/10.1080/08869634.1990.11678317>.
- Subramanian, R., Gayathri, S., Rathnavel, C., y Raj, V. 2012. Analysis of mineral and heavy metals in some medicinal plants collected from local market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2: S74-S78. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60133-6](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60133-6).
- Teixeira, M. L., Cardoso, M. D. G., Figueiredo, A. C. S., Moraes, J. C., Assis, F. A., de Andrade, J., y de Albuquerque, L. R. M. 2014. Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L. Chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. *American Journal of Plant Sciences*. 5:9 <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.59131>.
- Telci, I., Sahbaz, N. I., Yilmaz, G., y Tugay, M. E. 2004. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Economic Botany*, 58: 721. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)058\[0721:aaccos\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)058[0721:aaccos]2.0.co;2).
- Thomas, P. S., Essien, E. E., Ntuk, S. J., y Choudhary, M. I. 2017. *Eryngium foetidum* L. essential oils: chemical composition and antioxidant capacity. *Medicines*. 4: 19-24. <https://doi.org/10.3390/medicines4020024>.
- Varga, F., Carović-Stanko, K., Ristić, M., Grdiša, M., Liber, Z., y Šatović, Z. 2017. Morphological and biochemical intraspecific characterization of *Ocimum basilicum* L. *Industrial Crops and Products*. 109: 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.018>.

- Wong, K. C., Feng, M. C., Sam, T. W., y Tan, G. L. 1994. Composition of the Leaf and Root Oils of *Eryngium foetidum* L. *Journal of Essential Oil Research*. 6: 369-374. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698401>.
- Yildiz, H. 2016. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of essential oil and ethanol extract of *Coriandrum sativum* L. leaves from Turkey. *International Journal of Food Properties*. 19: 1593-1603. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1092161>.
- Yu, J. Y., Song, H. H., Kim, B. G., Park, H. J., Choi, K. S., y Kwon, Y. E. 2009. Relative bioavailability of generic and branded 250-mg and 500-mg oral chlorphenesin carbamate tablets in healthy Korean volunteers: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover trial. *Clinical Therapeutics*. 31: 2735-2743. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.11.036>.
- Zhang, J. W., Li, S. K., y Wu, W. J. 2009. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules*. 14: 273-278. <https://doi.org/10.3390/molecules14010273>.
- Złotek, U., Michalak-Majewska, M., y Szymanowska, U. 2016. Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food chemistry*. 213: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.052>.
- Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., ... y Al-Deyab, S.S. 2011. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *International Journal of Electrochemical Science*. 6: 691-704. [https://doi.org/10.1016/s1452-3981\(23\)15027-9](https://doi.org/10.1016/s1452-3981(23)15027-9).
- Zoubiri, S., y Baaliouamer, A. 2010. Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chemistry*. 122: 1226-1222 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.119>.

Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant's Natural Extracts: Synthesis Mechanisms and Applications

Síntesis de Nanopartículas Metálicas Usando Extractos Naturales de Plantas:
Mecanismos de Síntesis y Aplicaciones

D. C. Bouttier-Figueroa^{1*}, M. Cortez-Valadez², M. Flores-Acosta³, R. E. Robles-Zepeda¹

¹ Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Calle Rosales y Blvd. Luis Encinas S/N, Col. Centro. C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México

² CONACYT-Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³ Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles have a wide range of applications in health, electronics, optics, magnetism, bioremediation, chemistry, and materials science. Several methods used to produce nanoparticles are not friendly to the environment, so this review highlights the benefits of using plant extracts to prepare metallic nanoparticles to investigate an eco-friendly method. Plant extracts contain secondary metabolites, including flavonoids, alkaloids, terpenoids, phenolic compounds, polysaccharides, amino acids, and proteins. The compounds present in the extracts can reduce metal ions from salts and allow the formation of nanoparticles. The fundamentals of the *in-situ* nanoparticle synthesis were reviewed, a list of various plants used was made, the mechanisms proposed for nanoparticle synthesis, and finally, applications in several areas were addressed.

Keywords: Plant Extract; Metallic Nanoparticles; Formation Mechanism; Green Synthesis.

RESUMEN

Las nanopartículas metálicas tienen una amplia gama de aplicaciones en los sectores de la salud, la electrónica, la óptica, el magnetismo, la biorremediación, la química y la ciencia de los materiales. Varios métodos utilizados para producir nanopartículas no son amigables con el medio ambiente, por lo que esta revisión destaca los beneficios del uso de extractos de plantas para preparar nanopartículas metálicas para investigar un método ecológico. Los extractos de plantas contienen metabolitos secundarios, incluyendo flavonoides, alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, polisacáridos, aminoácidos y proteínas. Los compuestos presentes en los extractos pueden reducir los iones metálicos de sales y permitir la formación de nanopartículas. Se revisaron los fundamentos de la síntesis de nanopartículas *in situ*, se realizó una lista de varias plantas utilizadas, los mecanismos propuestos para la síntesis de nanopartículas y, finalmente, se abordaron las aplicaciones en varias áreas.

Palabras clave: Extracto De Plantas; Nanopartículas Metálicas; Mecanismo De Formación; Síntesis Verde.

INTRODUCTION

In recent years, different researchers have improved their understanding of nanotechnology and focused their projects directly or indirectly on its associated topics. These studies include planning, synthesis, characterization, and evaluation of the properties obtained by modification of their size and shape. The term "nano", the keywords in these researches, comes from the Latin *nanus*, meaning "dwarf". This kind of technology is supported in physics, chemistry, materials science, biotechnology, and biosciences, among others, to achieve a multidisciplinary understanding of the phenomena that occur in the materials. A phenomenon called "nanorevolution" has been created, which aims to the manipulation and study of nanomaterials in a wide range of compositions, sizes, shapes, and morphologies (Kolahalam *et al.*, 2019; Hamers, 2017).

Nanoparticles are an important class of nanomaterials studied by nanotechnology, as they have applications in various fields, including those described by Hernández-Morales *et al.* (2019) who synthesized silver nanoparticles with antimicrobial capacity using *Salvia hispanica L.* seed extracts. Opris *et al.* (2017), synthesized gold nanoparticles using extracts of *Sambucus nigra L.* with the ability to lower the level of glucose in blood. It also reduces levels of inflammation and oxidative stress induced by hyperglycemia. Matinise *et al.* (2018) created iron-zinc oxide nanoparticles aided by *Moringa Oleifera* extract, with excellent electrochemical performance, suggesting great potential in this area. Lebaschi *et al.* (2017), employed extracts of *Camellia sinensis* to form palladium nanoparticles showing potent catalytic application for the synthesis of biaryls, by Suzuki cross coupling reaction and also reduction of 4-nitrophenol (4-NP) by NaBH₄. Samari *et al.* (2018), used extracts of *Mangifera indica L.* to synthesize silver nanoparticles capable of chemically sensing Hg²⁺ ions in water. Goutam *et al.* (2018) made use of *Jatropha curcas L.* for the green synthesis of titanium oxide, for the remediation of wastewater from tanneries, and Idrees *et al.* (2019) worked with *Sida acuta* extracts to develop silver nanoparticles that acted as suitable inhibitors for the corrosion of mild steel in 0.1 H₂SO₄ solutions. The European Union (EU) defines nano-

*Author for correspondence: Diego Bouttier Figueroa, Ramón Enrique Robles Zepeda
e-mail: diego.bouttier@unison.mx, robles.zepeda@unison.mx

Received: December 12, 2022

Accepted: September 14, 2023

Published: October 24, 2023

materials as "A natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range of 1 nm – 100 nm" (Gehr, 2018). However, in the biotechnological area the size of the particle used varies between 10 to 500 nm and rarely exceeds 700 nm (Mody *et al.*, 2010).

The main reasons nanomaterials showed different properties than bulk materials are due to surface effects, since atoms on the surface have fewer neighbors than bulk atoms. This is associated with less coordination and dissatisfied bonds in nanomaterials. Therefore, they are less stable. In addition, the smaller a particle, the larger fraction of atoms on the surface, and the higher the bonding energy per atom causing a high surface area and volume ratio rate, allowing them to react much faster. Also, are due to density of states, where groups of atoms tend to form bands, and the greater the number, the higher the state density; here a gap called "forbidden" is created, which is the energy that is occupied for an electron crosses a state from lower to higher energy. These vary as the density change, being able to modify the electrical, magnetic, biological properties of the materials, among others (Roduner, 2006).

The future of nanoparticles lies in synthesizing them using greenways, living beings such as plants, microorganisms, or fungi, and seeking their effectiveness in the market (Hoseinpour and Ghaemi, 2018). There are already products with nanoscale materials in their formulations, among them are Doxorubicin (Doxil), also known as Caelyx, a cancer treatment drug. The agent mixture is inside unilaminar liposomes coated with PEG (polyethylene glycol) and is called "PEGylated liposomes". Their size varies between 80 and 90 nm (Abdellatif and Alsowinea, 2021). Additionally, Remington Nano Silver Dryer, Infinity 230 Nano Silver Tourmaline Ceramic Folding Styler by Conair, and Zazen Professional Nano-Silver Ionic Hair-dryer are hair dryers with silver nanoparticles (Taylor *et al.*, 2017). Furthermore, Ostim is a calcium hydroxyapatite paste $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ that has osteoconduction skills, with crystals of 20 nm in diameter (Farjadian *et al.*, 2019). Sea Hawk Cukote Biocide Plus Red-3541 is a paint with biocidal capacity with copper oxide nanoparticles whose average size is 220 nm (Adeleye *et al.*, 2016). Nemozin is a burn ointment with zinc oxide nanoparticles of 200 nm (Swathi *et al.*, 2013). There are more than 1814 products whose ingredients include nanoparticles, the most predominant being silver (Vance *et al.*, 2015).

There are two methods for synthesizing nanoparticles: Top-Down and Bottom Up. Top-Down processes convert the bulk material into nano-sized particles by mechanical milling, laser ablation, or sputtering. For Bottom Up methods, nanoparticles are formed from smaller molecules created by the union of atoms or molecules. It can be made through solid state methods (physical vapor deposition, chemical vapor deposition), liquid state methods (Sol-gel, chemical reduction, hydrothermal), gas phase methods (pyrolysis

spray, laser ablation), biological methods (bacteria, fungi, plants), among others (microwaves, supercritical fluids, ultrasound) (Jamkhande *et al.*, 2019). Unfortunately, many of these methods need a lot of energy to operate or pollute substances, making them unattractive for industrial use. Social responsibility emphasizes the search for alternatives that are economical and take care of the environment. The biological synthesis of nanomaterials has been put into practice since it uses temperature, pH, and pressures considered mild conditions. In addition, it has advantages over other synthesis methods, including higher productivity and lower costs (Kalimuthu *et al.*, 2019; Sign *et al.*, 2018).

Biological synthesis uses microorganisms and plants (or their extracts). There is a particular interest in using plants because they have many phytochemicals including ketones, aldehydes, flavonoids, amides, terpenoids, carboxylic acids, phenols, and ascorbic acids. These components are known to reduce metal salts and create metal nanoparticles. However, although there are several studies on nanoparticles, the exact mechanism involved in this process remains uncertain (Singh *et al.*, 2018). Therefore, this review aims to present a current overview of the fundamentals of the synthesis of nanoparticles using the components found in plant extracts, the effect of reaction conditions, and the biological applications of these nanoparticles.

Fundamentals of Green Synthesis of Nanoparticles using Plant Extracts

Although the nanoparticle synthesis mechanisms are still under investigation, the formation of metal complexes is present in all reactions, so it is possible to consider the theory of the effective atomic number proposed by Lewis. This rule establishes that for coordination compounds, the summary of the electrons from the metal plus those donated by the ligands must be equal to the number of electrons present in the next noble gas, according to the period of the metal involved (Tolman, 1972).

During the synthesis of nanoparticles using natural extracts, the metal ions from precursors are captured and immobilized by different biological elements that function as ligands. Reduction and sintering processes are carried out to obtain the final product. The characteristics of nanoparticles depend on reaction conditions, being able to vary morphology, dispersion, performance, and size when modifying temperature, pH, and concentrations of precursors, among others (He *et al.*, 2017; Skandalis *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2017). Temperature, for example, influences nanoparticle size, reaction rate, and shape of nanoparticles. In ZnO nanoparticles synthesis using *Cherry* fruit extracts, studied at 25 °C, 60 °C and 90 °C, researchers observed that as the temperature increased, the nanoparticle size increased. This explains that the extract is rich in ascorbic acid, which becomes unstable with increasing temperature leading to an uncontrolled reduction process and particle aggregation (Malek-Mohammadi *et al.*, 2018). In an alternative study for silver nanoparticles synthesis using *Mangifera indica* leaf ex-

tract, the temperature was varied from ambient conditions to 80 °C, the intensity of SPR from ambient conditions to 40 °C was increased. This was due to the increase in reaction speed; between 60 °C and 80 °C, an increase in the amplitude of the peak was found accompanied by a decrease in the intensity of SPR, demonstrating that the ability to act as a reducing agent of the extract decreased and caused agglomerates of nanoparticles (Samari *et al.*, 2018). The temperature was also shown to affect the synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Piper retrofractum* fruit, where the temperature was increased from 25 °C to 80 °C, and is associated with larger particle sizes due to their agglomeration. In addition, high temperatures can denature compounds in the extracts, making them unavailable to react and forming longer nanoparticles (Amaliyah *et al.*, 2022).

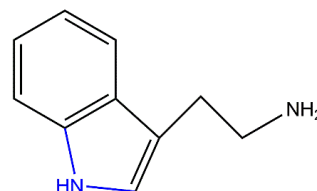
The pH of the synthesis process also effects nanoparticle size. In synthesizing silver nanoparticles using *Thymus algeriensis* extracts, pH from 3 to 11 was tested during the synthesis process. The resulting nanoparticles had a change in absorption length from 425 nm to 418 nm and an increase in signal intensity, indicating a decrease in size and that the alkaline environment favors the reducing and stabilizing capacity of the antioxidants present in the extract (Beldjilali *et al.*, 2020). It has been seen that pH affects the nucleation stage in *Piper chava* extracts used to form silver nanoparticles. As the pH increases from 5 to 9, the absorption in SPR increases and is accompanied by a shift towards blue. This is because at low pH the aggregation of nanoparticles is induced, instead of nucleation to form new ones. At more alkaline pH, the anionic functional groups in the extract are favored to bind with silver ions and increase the nucleation sites, resulting in smaller sizes (Mahuidin *et al.*, 2020). The same effect is observed on silver and gold nanoparticles synthesized using *Opuntia dillenii* extract. When varying the pH from 1 to 13, it is observed that at low pH, there is a broadening in the bands from UV-Vis spectrum, indicating the formation of large nanoparticles. While at more alkaline pH, a narrowing of the band is observed at 400 nm indicating smaller nanoparticles (Ahmed *et al.*, 2022).

Synthesis Using Natural Plant Extracts

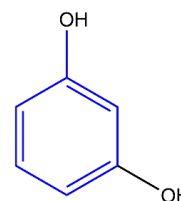
Plants are autotrophic organisms, biochemically additional to the primary metabolites necessary for the organisms' life. They synthesize secondary metabolites, also known as natural products, which are not essential for plant growth, but are compounds that help with adaptive processes, defense against predators or pathogens, ecological interactions, symbiosis, metal transport, and competition, among others. Secondary metabolites are classified into four categories according to the "British Nutrition Foundation": Terpenoids, Phenols, Nitrogen Compounds, and Sulfide Compounds (Mera *et al.*, 2019; E. Ahmed *et al.*, 2017). A representative structure of each category is shown in Figure 1. Secondary or phytochemical metabolites can act as reducing and stabilizing agents responsible for the synthesis of nanoparticles (Ovais *et al.*, 2018).



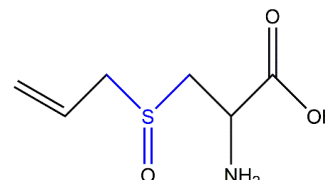
Terpene: Linalool



Nitrogen Containing Compounds: Triptamine



Phenol: Resorcinol



Sulphure Containing Compounds: Aliin

Figure 1. Representative structure of each group of secondary metabolites (The key structure is shown in blue).

Figura 1. Estructura representativa de cada grupo de metabolito secundarios (La estructura representativa se muestra en azul).

In general, nanoparticle synthesis involves mixing plant extracts with metal precursor salts. They can interact under different reaction conditions (pH, temperature, concentrations, etc.). Here, the formation of nanoparticles takes place in stages. It begins with the set of species equilibrium; once dissolved, the extracts and the precursor salt coordination complexes are formed between the metal ion and the phytochemicals of the extract. The sites where the nanoparticles will grow are created at the second nucleation stage. At the third stage of growth and adsorption, small adjacent nanoparticles come together to form particles of a larger size. Finally, during termination, the final shape of the nanoparticles occurs. The general synthesis mechanism is shown in Figure 2. The following operations consist of purification by centrifugation and washing until the impurities present are removed (Naikoo *et al.*, 2021; Behzad *et al.*, 2021; Bouttier-

Figueroa *et al.*, 2019a). As expected, results in the synthesis of nanoparticles show that the extract and its concentration affect the size and morphology of the nanoparticles, while temperature and pH affect the agglomeration process (Erjaee *et al.*, 2017; Koshy, 2017).

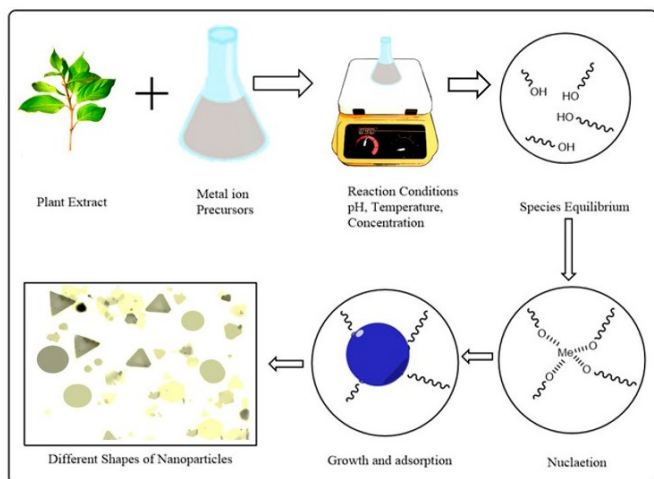


Figure 2. General mechanism for nanoparticles synthesis utilizing plant extracts (Me = metallic ion).

Figura 2. Mecanismo general para la síntesis de nanopartículas utilizando extractos de plantas (Me = ion metálico).

A list of plants used for the synthesis of nanoparticles between 2017 and 2022 is presented in Table 1. It is observable that the main phytochemicals involved in the synthesis of nanoparticles are phenolic compounds, flavonoids, carboxylic acids, carbohydrates, terpenoids, alkaloids, and proteins. They contain functional groups capable of coordinating with, and reduce, metal ions. Extracts of *Azadirachta indica*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Murraya koenigii*, *Moringa oleifera*, *Tamarindus indica*, and *Spinacea oleracea* contain phenolic compounds and flavonoids that act as covering agents, preventing agglomeration and stabilizing the formation of copper oxide nanoparticles (Rehana *et al.*, 2017; Al-Jawjari *et al.*, 2022). Extracts of *Aloe vera*, *Hibiscus sabdariffa*, *Atalantia monophylla*, *Punica granatum*, *Ocimum americanum*, *Beta vulgaris*, *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum verum*, *Brassica oleracea* var. *Itálica*, *Acalypha fruticosa* L., *Alchornea laxiflora*, and *Syzygium Cumini* contain phenolic compounds, flavonoids, tannins, organic acids, and terpenoids that can trigger the reduction of zinc salts and control the size of zinc oxide nanoparticles (Mahendiran *et al.*, 2017; Vijayakumar *et al.*, 2017; Mohamad *et al.*, 2019; Narendra *et al.*, 2019; Mohanan *et al.*, 2020; Vijayakumar *et al.*, 2019; Ekennia *et al.*, 2020; Rafique *et al.*, 2022). *Origanum vulgare* L. contains phenolic and carbohydrate compounds that play a vital role in the reduction of Pd²⁺ ions and act as stabilizing agents for palladium nanoparticles (Rafi *et al.*, 2017). *Moringa oleifera* leaves contain amino acids, alkaloids, flavonoids, and phenolic compounds that facilitate the synthesis of iron nanoparticles (Katata-Seru *et al.*, 2018). The extracts of *Annona muricata*, *Coleus aromaticus*, *Tasmanian lanceolata*, *Backhousia citriodora* and *Tecoma capensis*

have flavonoids, terpenoids and proteins responsible for the reduction of gold ions. In addition, they help in the formation and stabilization of synthesized nanoparticles (Folorunso *et al.*, 2019; Boomi *et al.*, 2018; Khandanlou *et al.*, 2020; Hosny *et al.*, 2022). *Tecoma stans* L. contains hydroxyl groups, alkenes, alkynes, flavonoids, carbohydrates, amines, and phosphates that act in the synthesis and formation of magnesium oxide nanoparticles (Nguyen *et al.*, 2021). *Atriplex halimus* contains glycosides, terpenoids, flavonoids, and alkaloids involved in reducing and stabilizing palladium nanoparticles (Eltaweil *et al.*, 2022). The synthesis of silver nanoparticles has been the favorite of several research groups. Several plant extracts have been used among them: *Buddleja globosa hope*, *Lantana camara* L., *Viscous cleome* L., *Sida cordifolia*, *Psidium guajava* L., *Amaranthus cruentus*, *Achillea millefolium* L., *Phyllanthus urinaria*, *Pouzolzia zeylanica*, *Scoparia dulcis*, *Piper colubrinum*, *Phoenix dactylifera* L., and *Camellia sinensis*. These have in common the presence of carboxylic, hydroxyl, carbonyl, and phenolic groups that are responsible for the reduction of Ag⁺ ions to Ag⁰ and act as a coating on the synthesized nanoparticles (Carmona *et al.*, 2017; Shriniwas *et al.*, 2017; Lakhmanan *et al.*, 2018; Naga *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Baghani *et al.*, 2020; Yousaf *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2020; Santhoshkumar *et al.*, 2021; Laouini *et al.*, 2021).

Secondary metabolites for nanoparticle synthesis

The extracts used for nanoparticle synthesis have a wide variety of secondary metabolites involved in nanoparticle reduction, formation, and stabilization. Phytochemicals in the extracts include phenols, flavonoids, alkaloids, terpenoids, proteins, carbohydrates, and amino acids.

Phenols

Phenols are chemical compounds that contain a hydroxyl group (-OH) attached to an aromatic hydrocarbon. In plants, the term polyphenol is usually used for secondary metabolites from the biochemical pathways of shikimic acid. They may have more than one phenolic ring and do not contain functional groups based on nitrogen in their structure (Cirkovic *et al.*, 2018). Below are reaction mechanisms for the synthesis of nanoparticles involving phenols. Gallic acid has been shown to interact with Au⁺³ ions by releasing electrons and reduce them to gold atoms. It has been proposed to form an intermediate complex during reduction that oxidizes to form quinones and gold nanoparticles. Quinones are inferred to remain on the surface of the nanoparticles, preventing their aggregation for prolonged periods (Ahmad *et al.*, 2019). The proposed mechanism is shown in Figure 3a. In the case of silver nanoparticles, gallic acid causes the reduction of Ag ions. After reduction, it is oxidized to its quinone form and the carboxylic group (-C = O) present in the oxidized form coordinates with the surface of the nanoparticles to stabilize them (Bhutto *et al.*, 2018). The schematic representation is shown in Figure 3b. Combining these molecules with metallic copper salts gives a polyphenolic complex with the Cu²⁺ ion, whose reduction generates nanoparticles of Cu⁰. The

Table 1. Characteristics of nanoparticles synthesized with natural extracts from different plants species.**Tabla 1.** Características de las nanopartículas sintetizadas con extractos naturales de diferentes especies de plantas.

Plant Species	Origin of the Extract	Nanoparticle	Nanoparticle Size (nm)	Functional Group Involved on Synthesis	Effect	Reference
<i>Azadirachta indica</i> , <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> , <i>Murraya koenigii</i> , <i>Moringa oleifera</i> and <i>Tamarindus indica</i>	Leaves	CuO	Average size of 12	Phenolic compounds and flavanoids	Anticancer	(Rehana <i>et al.</i> , 2017)
<i>Aloe vera</i> and <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Leaves	ZnO	9 to 18	Phenolic compounds and flavonoids	Antibacterial, antioxidant, and anticancer	(Mahendiran <i>et al.</i> , 2017)
<i>Buddleja globosa</i> hope	Leaves	Ag	1 to 53	Phenols and carboxylic groups	-	(Carmona <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lantana camara</i> L.	Leaves	Ag	410 to 450	Carboxylic, hydroxyl, carbonyl, and phenyl groups	Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic on Brine shrimp	(Shriniwas <i>et al.</i> , 2017a)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Leaves	Pd	2 to 20	Phenolic compounds and glycoside	Catalytic activity	(Rafi <i>et al.</i> , 2017)
<i>Atalantia monophylla</i>	Leaves	ZnO	30	Tannin, organic acids, terpenoids, aromatic dicarboxylic acid, and amides	Antibacterial	(Vijayakumar <i>et al.</i> , 2018)
<i>Moringa oleifera</i>	Seeds	Fe	2.6 to 7.4	Amino acids, alkaloids, flavonoids, and phenolic compounds	Antibacterial and coagulant	(Katata <i>et al.</i> , 2018)
<i>Cleome viscosa</i> L.	Fruit	Ag	5 to 30	Alkaloids, phenolic compounds, amino acids, carbohydrates, and tannins	Antibacterial and anticancer	(Lakshmanan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sida cordifolia</i>	Whole plant	Ag	3 to 8	Alkaloids, carbohydrates, proteins, glycosides, flavonoids, and tannins	Antibacterial	(Naga <i>et al.</i> , 2018)
<i>Psidium guajava</i> L.	Leaves	Ag	Average size of 25	Flavonoids and polyphenolic groups	Antibacterial	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Annona muricata</i>	Leaves	Au	27 to 32	Flavonoids, terpenoids, and proteins	Antibacterial and antifungal	(Folorunso <i>et al.</i> , 2019)
<i>Punica granatum</i>	Peel	ZnO	32.98 to 81.84	Pinucalagin, ellagic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, and gallic acid	Antibacterial and anticancer	(Mohamad <i>et al.</i> , 2019)
<i>Coleus aromaticus</i>	Leaves	Au	Average size of 80	Phenolic hydroxyl, aromatic amines, and polyphenol groups	Antibacterial and anticancer	(Boomi <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ocimum americanum</i>	Whole plant	ZnO	Average size of 21	Phenol, hydroxyl, and carboxyl groups	Antibacterial and anticancer	(Narendra <i>et al.</i> , 2019)
<i>Amaranthus cruentus</i>	Flowering shoot parts	Ag	Average size of 15	Aromatic compound, proteins, hydroxyl groups, and carboxylic acids	Antibacterial and anticancer	(Baghani <i>et al.</i> , 2020)
<i>Tasmannia lanceolata</i> and <i>Backhousia citriodora</i>	Leaves	Au	Average size of 7.10	Terpenoids, flavonoids, and phenolic compounds	Anticancer	(Khandanlou <i>et al.</i> , 2020)
<i>Achillea millefolium</i> L.	Whole plant	Ag	14.27 to 20.77	Proteins, flavonoids, and phenols such as tannic acid	Antibacterial and antioxidant	(Yousaf <i>et al.</i> , 2020)
<i>Beta vulgaris</i> , <i>Cinnamomum tamala</i> , <i>Cinnamomum verum</i> , and <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Whole plant	ZnO	20 to 47	Hydroxyl groups, proteins, aldehydes, alkanes, alkenes, ketones, and alcohol	Antibacterial and antifungal	(Mohanani <i>et al.</i> , 2020)
<i>Phyllanthus urinaria</i> , <i>Pouzolzia zeylanica</i> , and <i>Scoparia dulcis</i>	Leaves	Ag	4 to 52	Tannins, flavonoids, phenolics, and terpenoids compounds	Antifungal	(Nguyen <i>et al.</i> , 2020)
<i>Acalypha fruticosa</i> L.	Leaves	ZnO	Average size of 50	Flavonoids	Antibacterial	(Vijayakumar <i>et al.</i> , 2019)
<i>Piper colubrinum</i>	Leaves	Ag	10 to 50	Compounds with with OH and CO groups	Antibacterial	(Santhoshkumar <i>et al.</i> , 2021)
<i>Tecoma stans</i> L.	flower, bark, and leaves	MgO	20 to 50	Hydroxyl/amino groups, alkene or alkyne, flavonoids or carboxylic compounds, saturated primary alcohol, carbohydrates, amines, and phosphates	Treatment of hazardous dyes from the wastewater	(Nguyen <i>et al.</i> , 2021)

Plant Species	Origin of the Extract	Nanoparticle	Nanoparticle Size (nm)	Functional Group Involved on Synthesis	Effect	Reference
<i>Alchornea laxiflora</i>	Leaves	ZnO	Average size of 200	Polyphenols, flavonoids, tanins, alkaloids, and saponins	Photocatalyst	(Ekennia <i>et al.</i> , 2021)
<i>Citrus limon</i>	Fruit	Cu	5 to 28	Alcohols, phenols, carboxylic acids, and amino groups	Antibacterial	(Amer <i>et al.</i> , 2021)
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Leaves	Ag/Ag ₂ O	37.71 to 28.66	Carboxyl, carbonyls, amides, and phenols	Photocatalytic activity for azo dye degradation	(Laouini <i>et al.</i> , 2021)
<i>Syzygium Cumini</i>	Leaves	ZnO	64 to 78	Hydroxyl and amide groups	Fertilizer in agriculture and catalyst for dye removal from polluted water	(Rafique <i>et al.</i> , 2022)
<i>Tecoma capensis</i>	Leaves	Au	20 to 25	Alkaloids, flavonoids, glycosides, terpenoids, tannins, and phenolic compounds	Photocatalytic, anticancer and antioxidant	(Hosny <i>et al.</i> , 2022)
<i>Spinacea oleracea</i>	Leaves	CuO	13 to 17	Phenols and flavonoids	Antioxidant and anticancer	(Al-Jawhari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Atriplex halimus</i>	Leaves	Pt	1 to 3	Glycosides, terpenoids, flavonoids, and alkaloids	Antibacterial, antioxidant, and catalytic	(Eltaweil <i>et al.</i> , 2022)
<i>Camellia sinensis</i>	Leaves	Ag	15 to 33	Polyphenols, proteins, flavonoids, saponins, and glycosides	Antibacterial	(Widatalla <i>et al.</i> , 2022)

ions can subsequently be oxidized with oxygen to form stable CuO nanoparticles (Veisi *et al.*, 2021). The mechanism of biogenesis is shown in Figure 3c. The general mechanism for the synthesis of nanoparticles using phenols is described by Malapermal *et al.* (2017), who speculate that the conversion of biomolecules with C-OH groups to C=O groups is responsible for the reduction of ions, in the case of their study Ag⁺ to Ag⁰, leaving as a result a keto compound. The proposed mechanism is illustrated in Figure 3d.

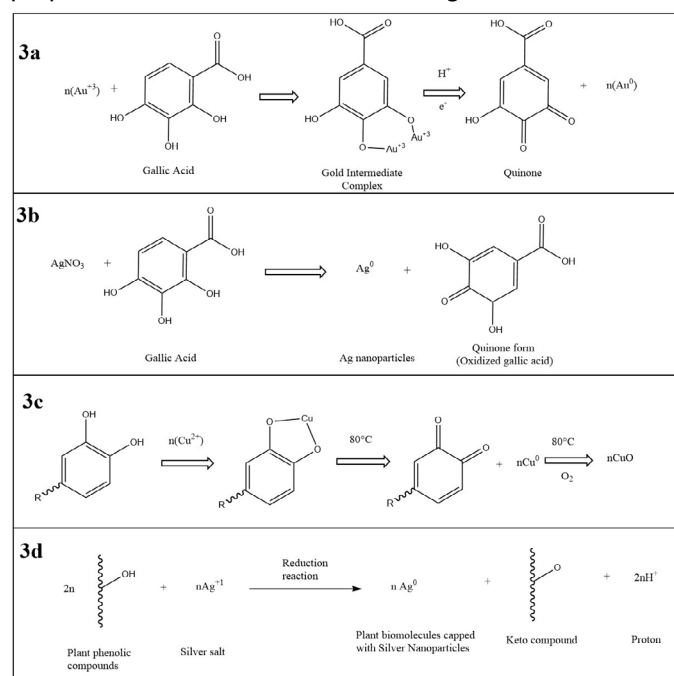


Figure 3. Proposed mechanisms for nanoparticle synthesis from phenols compounds. Adapted from references [Cirkovic *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2019; Bhutto *et al.*, 2018; Veisi *et al.*, 2021; Malapermal *et al.*, 2017].

Figura 3. Mecanismos propuestos para la síntesis de nanopartículas a partir de compuestos fenólicos. Adaptado de referencias [Cirkovic *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2019; Bhutto *et al.*, 2018; Veisi *et al.*, 2021; Malapermal *et al.*, 2017].

Flavonoids

They are hydroxylated phenolic substances synthesized by plants in response to microbial infections. The chemical structure is a propane diphenyl skeleton with fifteen carbon atoms in its primary nucleus: two six-membered rings linked with a three-carbon unit, which may or may not be a part of a third ring. In addition, two benzene rings (rings A and B) are linked through a third heterocyclic oxygen-containing pyrene ring (Karak, 2019). Flavonoids have hydroxyl and carbonyl groups that can bind metal ions through a chelating effect. This chelating ability is associated with a nucleophilic character of the aromatic ring. The antioxidant property of flavonoids is related to their ability to donate electrons and hydrogen atoms. Trivalent gold ions can form complexes in aqueous solutions with flavonoids when they oxidize to ketone groups and form the nucleus of nanoparticles (Irfan *et al.*, 2017). The proposed mechanism is shown in Figure 4a.

The flavonoid orientin contains an aromatic hydroxyl group capable of adhering to nickel ions by forming complexes with each other. Subsequently, an annealing process is applied to break down the complex and form NiO nanoparticles (Mayedwa *et al.*, 2018). The proposed mechanism of orientin with nickel ions is shown in Figure 4b. Quercetin contains hydroxyl groups with high reductive activity. It has been used to reduce Ag⁺ ions by forming complex intermediates, followed by oxidation by hydrogen abstraction forming a hydrate (Kobylinska *et al.*, 2020). The schematic is shown in Figure 4c. A general proposal for the formation of nanoparticles with flavonoids, taking silver as an example, is given by Sherin *et al.* (2020). They indicated that hydroxyl groups are strong ligands that can reduce ions from Ag⁺ to Ag⁰. They suggested that if sodium hydroxide is added to the reaction medium, the reducing power of these phytomolecules is improved, and the formation can be accelerated at

room temperature. The possible proposed mechanism is illustrated in Figure 4d.

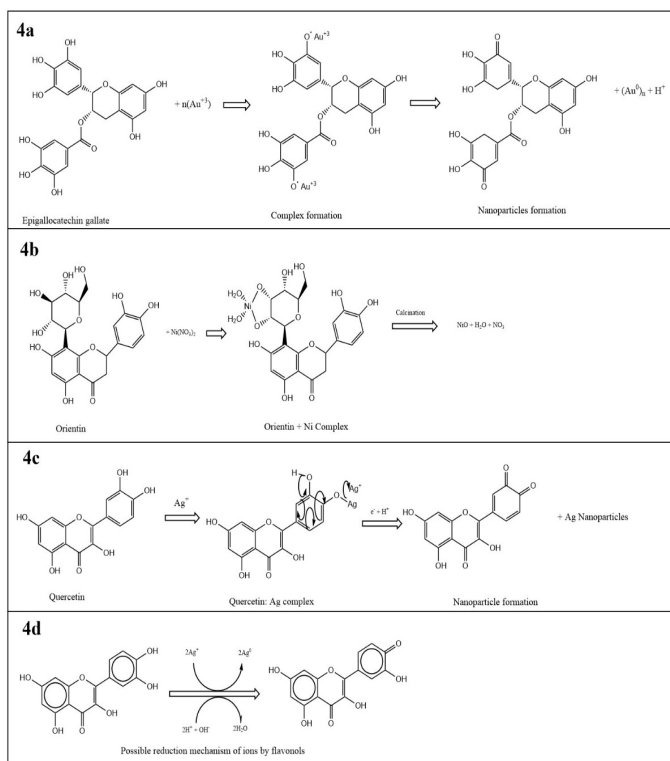


Figure 4. Proposed mechanisms for nanoparticle synthesis from flavonoids compounds. Adapted from references [Irfan *et al.*, 2017; Mayedwa *et al.*, 2018; Kobylinska *et al.*, 2020; Sherin *et al.*, 2020].

Figura 4. Mecanismos propuestos para la síntesis de nanopartículas a partir de compuestos flavonoides. Adaptado de referencias [Irfan *et al.*, 2017; Mayedwa *et al.*, 2018; Kobylinska *et al.*, 2020; Sherin *et al.*, 2020].

Alkaloids

These are molecules present in plants with a nitrogen at any position of the molecule but must not belong to an amide or a peptide bond (Rios *et al.*, 1989). They have demonstrated participation in the formation of platinum and palladium nanoparticles; alkaloids of *Peganum harmala* seeds showed rearrangement and deprotonation in their O-H and C-O groups, indicating the participation in the bioreduction of nanoparticles (Fahmy *et al.*, 2021). In another study, this same plant was used to reduce silver nanoparticles. In this case, five

main alkaloids, Harmine, Harmaline, Harmalol, Vasicine, and Vasicinone were identified, indicating the participation of the same groups in the reduction of nanoparticles (Almadiy *et al.*, 2018). *Conocarpus lancifolius* presents two alkaloids, Scopolamin and Hyoscine, that can act as metal chelators and participate in silver nanoparticle formation (Raheema *et al.*, 2020). *Terminalia catappa* has alkaloids involved in Nd_2O_3 nanoparticles formation, acting as essential sources for obtaining $\text{Nd}(\text{OH})_3$ complexes in hydrolysis processes necessary for the formation of nanoparticles (Lembang *et al.*, 2018). Although it is known that alkaloids participate in the formation of nanoparticles, there are still few publications on the subject, and there is a lack of deepening in the reaction mechanism of the formation process. Hence, further research in this area is necessary.

Terpenoids

They are metabolites of plants with different atomic carbon units, where $C = 5, 10, 15, 20, \dots, n > 40$, and are thus classified as hemiterpenes (C5), monoterpenes (C10), sesquiterpenes (C15), diterpenes (C20), triterpenes (C30), tetraterpenes or carotenoids (C40), and polyterpenes ($C_n, n > 40$) (Proshkina *et al.*, 2020). Extracts of only terpenes from *Lantana chamber* plant have been used to synthesize silver nanoparticles; these participate in reducing Ag^+ ions to Ag^0 ions (Shriniwas *et al.*, 2017b). *Withania coagulans* has poly-oxygenated biomolecules called withanolides (C28 - steroidal lactone triterpenoids), which are involved in synthesizing silver nanoparticles (Tripathi *et al.*, 2019). The Terpenoids present in *Annona squamosa* help in the synthesis of gold nanoparticles; their hydroxyl and carbonyl groups are complexed with Au^3 ions and reduced to Au^0 by the oxidation of carbonyl and carboxyl groups (Gangapuram *et al.*, 2018). Pentacyclic terpenoids (lupeol and β -sitosterol) of *Euclea natalensis* participate in forming zirconium oxide nanoparticles, and the -OH groups are responsible for the reduction. The tautomeric transformation of enol compounds to keto is thought to release hydrogen atoms, accountable for removing the zirconium molecule (Da Silva *et al.*, 2019). The proposed mechanism is shown in Figure 5a. In this aspect, research has begun to offer reaction mechanisms, but it is still necessary to understand the process in detail.

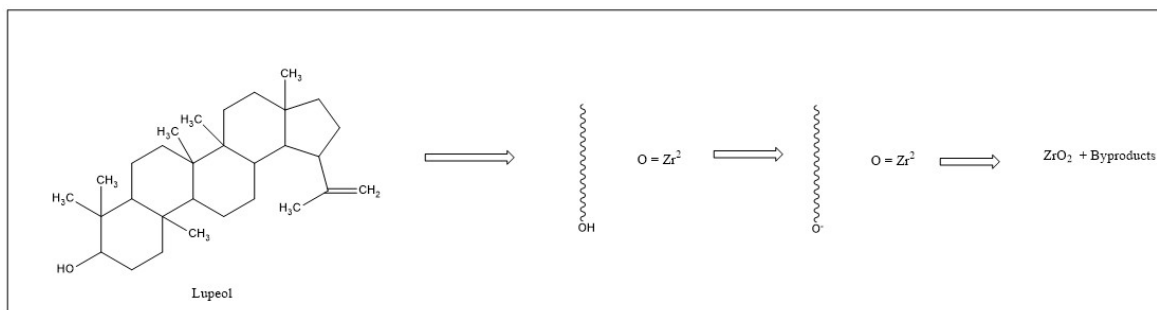


Figure 5. Proposed mechanism for nanoparticle synthesis from terpenoid compounds. Adapted from Gangapuram *et al.* (2018).

Figura 5. Mecanismo propuesto para la síntesis de nanopartículas a partir de compuestos terpenoides. Adaptado de Gangapuram *et al.* (2018).

Amino acids and proteins

Proteins are biomolecules constructed from the covalent polymerization of amino acids (Mora *et al.*, 2020). *Camellia sinensis* extracts have been used for the synthesis of zinc oxide nanoparticles. These contain amino acids that are not directly involved in the formation of nanoparticles but stabilize the nanoparticles in suspension (Dhanemozhi *et al.*, 2017). Ajwa and Barni were used for the synthesis of platinum nanoparticles. As a result, it was found that amino acids and proteins participate in coating the nanoparticles (Al-Radadi, 2019). *Carissa carandas* proteins coat and stabilize nanoparticles, as demonstrated by being employed to synthesize silver nanoparticles. Hydroxyl, carbonyl, and other functional groups in amino acids and peptides (C=O, -OCH, C-O) can bind metals, forming a coating around the metal nanoparticle. Also, the presence of the -OH group in benzenes contained in the extract participate in the formation of nanoparticles since they can release a proton, change to its anionic form, stabilize itself by its resonance structure, provide electrons that function as reducing agents, and oxidize the metallic salt (Joshi *et al.*, 2018). *Moringa oleifera* extract proteins also function as coating agents of nanoparticles, in this case confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM) (Mateus *et al.*, 2018). The participation of these biomolecules is not directly related to the process of nanoparticle formation but to their stabilization.

Carbohydrates

These molecules composed of carbon and hydrogen atoms, have different monomeric units and degrees of polymerization; glycosidic bonds join them and in nature, they are found together with proteins, lipids, amino acids, etc. The binding of various carbohydrates is called a polysaccharide (Mena-García *et al.*, 2019). Carbohydrates present in *Astragalus membranaceus* possess weak reducing activity, and have been used for the synthesis of silver nanoparticles due to the electron-accepting nature of Ag⁺ ions and the electron-donating nature of hydroxyl groups in polysaccharides (Ma *et al.*, 2017). *Acacia* gum and pectin have been used for the synthesis of palladium nanoparticles. They have reduced

sugars in their structure, which coordinates metal ions in their carbonyl groups, allowing the synthesis of metal nanoparticles (Emam *et al.*, 2020). A representative schematic is shown in Figure 6. *Castanea mollissima* has glucans with a large number of OH groups that have been used to synthesize selenium nanoparticles (Li *et al.*, 2019). Galactomannans in *Prosopis spp* can function as nanoreactors to synthesize zinc oxide nanoparticles by coordinating the OH groups present in these polysaccharides (Bouttier-Figueroa *et al.*, 2019b).

Nanoparticles applications

Recently, nanotechnology has emerged as a science with a wide range of applications. Nanoparticles formed using nanotechnology have qualities that have allowed them to be used in different fields, such as food, agriculture, medicine, catalysis, and water treatment.

Food

Silver nanoparticles synthesized from *Madhuca latifolia* L. extracts can inhibit bacterial growth and be used in food packaging. Nanoparticles act as molecules that can penetrate the bacterial cell wall and affect their metabolic pathways. They can destabilize ribosomal function and DNA, causing cell death (Biswal and Misra, 2020).

Agriculture

Aqueous extract of *Ulva lactuca* allows the synthesizing of silver nanoparticles capable of inhibiting the proliferation of bacteria and fungi of agricultural importance by functioning as pesticides. Nanoparticles come into contact with bacteria entering their cell wall and interrupt cell permeability by interacting with enzymatic cofactors, sulfur, and phosphorous groups of DNA. In the case of fungi, the nanoparticles form pits on the cell surface, which causes changes in morphology and prevents proliferation (Amin, 2020). The extract of *Cornus mas* fruits has been used to synthesize Fe₂O₃ nanoparticles to improve the growth of barley seedlings serving as fertilizers. Nanoparticles work as an iron source; when absorbed by plants they change the concentrations of reactive oxygen species, causing a stimulus in the plant's growth (Rostamizadeh *et al.*, 2020).

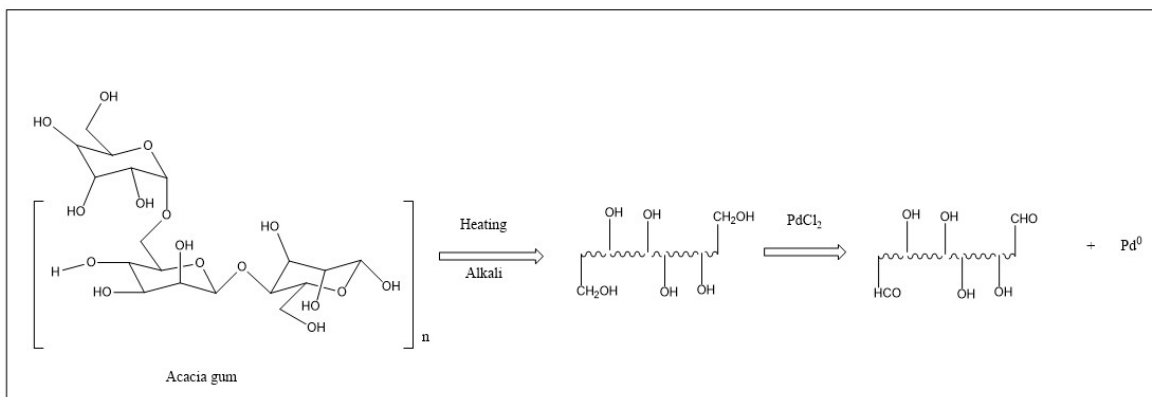


Figure 6. Proposed mechanism for nanoparticle synthesis from a polysaccharide compound. Adapted from Emam *et al.* (2020).

Figura 6. Mecanismo propuesto para la síntesis de nanopartículas a partir de polisacáridos. Adaptado de Emam *et al.* (2020).

Water treatment

Ficus benjamina leaves have been used to obtain extracts to form silver nanoparticles that can remove Cd(II) from contaminated water, functioning as ionic or elemental removers. Their results indicated that nanoparticles behave according to a Freundlich model, where Cd(II) adsorption occurs due to multiple layers of heterogeneity of the adsorbent surface (Al-Qahtani, 2017). *Fumariae herba* has been used to synthesize platinum nanoparticles, which can perform catalysis activities to remove organic dyes. This ability is attributed to their relatively large surface-to-volume ratios. Platinum nanoparticles showed enhanced catalytic activity for the degradation of organic dyes (Dobrucka, 2019).

Medicine

The leaves of *Coptis chinensis* allow the synthesis of silver nanoparticles with anticancer activity against lung cancer cells. Nanoparticles interact with cells, affecting the metabolic pathways of mitochondria causing apoptosis and destruction of the mitochondrial membrane. Nanoparticles alter the production of Bcl2 family proteins, altering cell susceptibility to promote the production of caspase 3 and Bax proteins that cause apoptosis (Pei *et al.*, 2019). *Andrographis paniculata*, *Phyllanthus niruri*, and *Tinospora cordifolia* have in their extracts agents capable of synthesizing silver nanoparticles with antiviral activity against the chikungunya virus. Nanoparticles interfere with the virus binding to the host cell, preventing it from entering, but the exact mechanism of action still needs to be studied (Sharma *et al.*, 2019). Zinc oxide synthesized with *Urtica dioica* extract has been employed in rats to lower insulin levels, functioning as an antidiabetic agent. Zinc present in nanoparticles acts by mimicking the activity of insulin, the fundament being that the pancreas of a healthy person contains a greater amount of zinc than a person with diabetes (Bayrami *et al.*, 2020).

Paeonia emodi has been used to synthesize gold nanoparticles essential for cardiovascular diseases treatment. Nanoparticles are loaded with drugs since they can enter tissues and release them directly at the site of action. They decreased the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, and creatine phosphokinase, which cause heart damage (Ibrar *et al.*, 2018). Zinc oxide nanoparticles have been synthesized with *Aloe socotrin* leaf extracts, allowing the distribution of antimicrobial agents. The nanoparticles eliminated microorganisms that cause urinary infections by destroying their membrane due to the formation of reactive oxygen species (Fahimmunisha *et al.*, 2020). Extracts of *Rose indica L* petals can synthesize zinc oxide nanoparticles, which can be used in nail paint with antifungal activity. Understanding of ZnO mechanism of action in fungi needs to be better developed. It is known that H₂O₂ is formed, and the creation of bonds between cellulose molecules in their hydroxyl groups and oxygen atoms leads to the inhibition of fungal growth (Tiwari *et al.*, 2017).

Electronic

Titanium oxide, synthesized from lemon peels, has optical and photocatalytic properties that allow its potential use in electronic devices. It is capable of degrading rhodamine B due to its high photocatalytic activity created by the rapid detachment capacity between the photogenerated electrons and holes (Nabi *et al.*, 2022).

Nanoparticles Packaging

Recent research avoids mentioning the materials used to store the synthesized nanoparticles. It is essential to consider an appropriate type of material to store the nanoparticles, preserve their properties, and allow transport in safe conditions. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has a section that regulates materials used to store food, drugs, and cosmetics. It can be extrapolated to nanoparticle storage. Permitted materials include (Marsh *et al.*, 2007):

Glass: It does not have aroma, is chemically inert, impermeable to gases, allows good insulation from the outside, can be produced in different ways, and being transparent, allows observation of the stored product.

Metal: Focuses on aluminum and steel. These provide excellent barriers to moisture, air, odors, light, and microorganisms; they are ductile, easily recyclable, and highly accepted by the consumers.

Plastics: They are chemically resistant and cheap to manufacture. In industrial applications, they can be heat-sealed, printed, and stored on-site. The main disadvantage is that they are permeable to light and gases.

Paper and cardboard: This material mainly stores and transports product-filled containers.

Nanoparticles characterization

After synthesizing nanoparticles, it is important to know their morphological and physicochemical properties since, depending on their size, shape, surface morphology, structure, and homogeneity, their properties can vary. The most used characterization techniques are: Uv-vis, XRD, FTIR, DLS, EDAX, SEM and TEM (Gour *et al.*, 2019).

- **UV-visible:** It is used to know the wavelength at which nanoparticles absorb, which is related to their Surface plasmon reverberation, providing information about their size.
- **XRD:** It is used to know the crystalline structure of nanoparticles.
- **FT-IR:** It is used to study the functional groups present on nanoparticles surface, which are responsible for the reduction and stabilization.
- **DLS:** Provides information about the surface charge of nanoparticles.
- **EDAX:** Estimates the abundance of elements present over nanoparticles surface.
- **SEM and TEM:** They provide information about nanoparticle morphology, size, and homogeneity.

Other techniques less used, include condensation particle counter, photon correlation spectroscopy, and field

emission scattering electron microscopy. Authors such as Mourdikoudis *et al.* (2018) have already described more details about the characterization techniques.

CONCLUSIONS

This review presented information on nanoparticle synthesis using different plant extracts with a particular interest in the reaction mechanisms involved in the formation. The synthesis using natural plant extracts has allowed the elaboration of materials greenly (friendly to the environment, cost reduction, easy obtaining of raw material, and use of non-toxic solvents). The biomolecules present in the extracts are directly related to the reduction of metal ions, participation in the capture of ions, formation of complexes, and finally, the protection of the synthesized material. The development of nanotechnology has allowed applications in different areas such as electronics, medicine, chemistry, physics, engineering, environment, etc. These materials are synthesized invitro and participate in many secondary metabolites in their formation, including alkaloids, carbohydrates, phenols, and Terpenoids. Recent research focuses on specific metabolites for their role in nanoparticle formation. Further studies on the role of selected metabolites in the formation of nanoparticles are needed. The current overview of nanoparticle storage needs to be described in the literature, and there is a research opportunity to study the effects on packaging. This review addresses the characterization techniques, emphasizing the role of each of them in order to introduce their fundamentals. In this way, it will be possible to understand their physical and chemical properties better and subsequently standardize production processes at the industrial level.

ACKNOWLEDGMENTS

D. C. Bouttier-Figueroa acknowledges the grant from CONAHCYT and the postdoctoral position at the Universidad de Sonora.

CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

REFERENCES

- Abdellatif, Ahmed A. H., and Abdullah Fahad Alsowinea. 2021. "Approved and Marketed Nanoparticles for Disease Targeting and Applications in COVID-19." *Nanotechnology Reviews* 10 (1): 1941–77. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0115>.
- Adeleye, Adeyemi S., Ekene A. Oranu, Mengya Tao, and Arturo A. Keller. 2016. "Release and Detection of Nanosized Copper from a Commercial Antifouling Paint." *Water Research* 102: 374–82. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.056>.
- Ahmed Anees, Rauf A., Hemed H. A., Qureshi M. N., Sharma R., Aljojani A. S. M., Alhumaydi F. A., Khan I., Alam A. and Rahman Md. M. 2022. "Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using *Opuntia dillenii* Aqueous Extracts: Characterization and Their Antimicrobial Assessment." *Journal of Nanomaterials*. Article ID 4804116, 17 pages. <https://doi.org/10.1155/2022/4804116>.
- Ahmad, Tausif, Mohamad Azmi Bustam, Muhammad Irfan, Muhammad Moniruzzaman, Hafiz Muhammad Anwaar Asghar, and Sekhar Bhattacharjee. 2019. "Mechanistic Investigation of Phytochemicals Involved in Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Aqueous *Elaeis guineensis* Leaves Extract: Role of Phenolic Compounds and Flavonoids." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 66 (4): 698–708. <https://doi.org/10.1002/bab.1787>.
- Ahmed, Ejaz, Muhammad Arshad, Muhammad Zakriyya Khan, Muhammad Shoaib Amjad, Huma Mehreen Sadaf, Iqra Riaz, Pakistan Sidra Sabir, et al. 2017. "Secondary Metabolites and Their Multidimensional Prospective in Plant Life." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6 (2): 205–14.
- Ahmed, Shakeel, Annu, Saif Ali Chaudhry, and Saiqa Ikram. 2017. "A Review on Biogenic Synthesis of ZnO Nanoparticles Using Plant Extracts and Microbes: A Prospect towards Green Chemistry." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 166: 272–84. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.011>.
- Al-Jawhari, Hala, Hanan Bin-Thiyab, and Nihal Elbialy. 2022. "In Vitro Antioxidant and Anticancer Activities of Cupric Oxide Nanoparticles Synthesized Using Spinach Leaves Extract." *Nano-Structures and Nano-Objects* 29: 100815. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2021.100815>.
- Almadiy, Abdulrhman A., Gomah E. Nenaah, and Dalia M. Shawer. 2018. "Facile Synthesis of Silver Nanoparticles Using Harmala Alkaloids and Their Insecticidal and Growth Inhibitory Activities against the Khapra Beetle." *Journal of Pest Science* 91 (2): 727–37. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0924-2>.
- Al-Qahtani, Khairia M. 2017. "Cadmium Removal from Aqueous Solution by Green Synthesis Zero Valent Silver Nanoparticles with Benjamina Leaves Extract." *Egyptian Journal of Aquatic Research* 43 (4): 269–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.10.003>.
- Al-Radadi, Najlaa S. 2019. "Green Synthesis of Platinum Nanoparticles Using Saudi's Dates Extract and Their Usage on the Cancer Cell Treatment." *Arabian Journal of Chemistry* 12 (3): 330–49. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.05.008>.
- Amaliyah S., Sabarudin A., Masruri M. and Sumitro S. B. 2022. "Characterization and antibacterial application of biosynthesized silver nanoparticles using *Piper retrofractum* Vahl fruit extract as bioreductor". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 12 (03): 103-114. DOI: 10.7324/JAPS.2022.120311.
- Amer, Mohammad W., and Akl M. Awwad. 2021. "Green Synthesis of Copper Nanoparticles by *Citrus limon* Fruits Extract, Characterization and Antibacterial Activity." *International Scientific Organization* 7 (1): 1–8.
- Amin, Hadeer Hanie. 2020. "Biosynthesized Silver Nanoparticles Using *Ulva lactuca* as a Safe Synthetic Pesticide (in Vitro)." *Open Agriculture* 5 (1): 291–99. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0032>.
- Baghani, Mohsen, and Ali Es-Haghi. 2020. "Characterization of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Amaranthus cruentus*." *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* 9 (3): 129–36. <https://doi.org/10.1680/jbibrn.18.00051>.

- Bayrami, Abolfazl, Shirin Haghgooe, Shima Rahim Poursan, Farid Mohammadi Arvanag, and Aziz Habibi-Yangjeh. 2020. "Synergistic Antidiabetic Activity of ZnO Nanoparticles Encompassed by *Urtica dioica* Extract." *Advanced Powder Technology* 31 (5): 2110–18. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2020.03.004>.
- Behzad, Farahnaz, Seyed Morteza Naghib, Mohammad Amin Jadidi kouhbanani, Seyede Nafise Tabatabaei, Yasser Zare, and Kyong Yop Rhee. 2021. "An Overview of the Plant-Mediated Green Synthesis of Noble Metal Nanoparticles for Antibacterial Applications." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 94: 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.12.005>.
- Beljilali M., Mekhissi K., Khane Y., Chaibi W., Belarbi L. and Bousalem S. 2020. "Antibacterial and Antifungal Efficacy of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using Leaf Extract of *Thymus algeriensis*." *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 30: 2126–2133. <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01361-3>
- Bhutto, Aijaz A., Şaban Kalay, S. T.H. Sherazi, and Mustafa Culha. 2018. "Quantitative Structure–Activity Relationship between Antioxidant Capacity of Phenolic Compounds and the Plasmonic Properties of Silver Nanoparticles." *Talanta* 189: 174–81. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.080>.
- Biswal, Achyuta Kumar, and Pramila Kumari Misra. 2020. "Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles for Prospective Application in Food Packaging and Biomedical Fields." *Materials Chemistry and Physics* 250 (January): 123014. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123014>.
- Boomi, P., R. M. Ganesan, G. Poorani, H. Gurumalles Prabu, S. Ravikumar, and J. Jeyakanthan. 2019. "Biological Synergy of Greener Gold Nanoparticles by Using *Coleus aromaticus* Leaf Extract." *Materials Science and Engineering C* 99 (May 2018): 202–10. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.105>.
- Bouttier-Figueroa, D. C., and M. Sotelo-Lerma. 2019. "Fabrication and Characterization of an Eco-Friendly Antibacterial Nanocomposite of Galactomannan/ZnO by in Situ Chemical Co-Precipitation Method." *Composite Interfaces* 26 (2): 83–95. <https://doi.org/10.1080/09276440.2018.1472457>.
- Carmona, Erico R., Noelia Benito, Tanya Plaza, and Gonzalo Recio-Sánchez. 2017. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Leaf Extracts from the Endemic *Buddleja globosa* Hope." *Green Chemistry Letters and Reviews* 10 (4): 250–56. <https://doi.org/10.1080/17518253.2017.1360400>.
- Cirkovic Velickovic, Tanja D., and Dragana J. Stanic-Vucinic. 2018. "The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17 (1): 82–103. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>.
- Dhanemozhi, A. Clara, V. Rajeswari, and S. Sathyajothi. 2017. "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticle Using Green Tea Leaf Extract for Supercapacitor Application." *Materials Today: Proceedings* 4 (2): 660–67. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.070>.
- Dobrucka, Renata. 2019. "Biofabrication of Platinum Nanoparticles Using *Fumariae herba* Extract and Their Catalytic Properties." *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.11.012>.
- Ekennia, Anthony, Dickson Uduagwu, Olawale Olowu, Obianuju Nwanji, Obinna Oje, Blessing Daniel, Sandra Mgbii, and Chimerem Emma-Uba. 2021. "Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Leaf Extracts of *Alchornea laxiflora* and Its Tyrosinase Inhibition and Catalytic Studies." *Micron* 141 (October 2020): 102964. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102964>.
- Eltaweil, Abdelazeem S., Manal Fawzy, Mohamed Hosny, Eman M. Abd El-Monaem, Tamer M. Tamer, and Ahmed M. Omer. 2022. "Green Synthesis of Platinum Nanoparticles Using *Atriplex halimus* Leaves for Potential Antimicrobial, Antioxidant, and Catalytic Applications." *Arabian Journal of Chemistry* 15 (1): 103517. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103517>.
- Emam, Hossam E., Nourhan M. Saad, Amira E.M. Abdallah, and Hanan B. Ahmed. 2020. "Acacia gum versus Pectin in Fabrication of Catalytically Active Palladium Nanoparticles for Dye Discoloration." *International Journal of Biological Macromolecules* 156: 829–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.018>.
- Fahimmunisha, Basheer Ahmed, Ramachandran Ishwarya, Mohamad S. AlSalhi, Sandhanasamy Devanesan, Marimuthu Govindarajan, and Baskaralingam Vaseeharan. 2020. "Green Fabrication, Characterization and Antibacterial Potential of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Aloe socotrina* Leaf Extract: A Novel Drug Delivery Approach." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 55 (November 2019): 101465. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101465>.
- Fahmy, Sherif Ashraf, Iten M. Fawzy, Basma M. Saleh, Marwa Y. Issa, Udo Bakowsky, and Hassan Mohamed El Said Azzazy. 2021. "Green Synthesis of Platinum and Palladium Nanoparticles Using *Peganum harmala* L. Seed Alkaloids: Biological and Computational Studies." *Nanomaterials* 11 (4): 1–15. <https://doi.org/10.3390/nano11040965>.
- Farjadian, Fatemeh, Amir Ghasemi, Omid Gohari, Amir Roointan, Mahdi Karimi, and Michael R. Hamblin. 2019. *Nanopharmaceuticals and Nanomedicines Currently on the Market: Challenges and Opportunities. Nanomedicine*. Vol. 14. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>.
- Folorunso, Aderonke, Sunday Akintelu, Abel Kolawole Oyebamiji, Samuel Ajayi, Babawale Abiola, Ibrahim Abdusalam, and Adetoun Morakinyo. 2019. "Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles from Leaf Extracts of *Annona muricata*." *Journal of Nanostructure in Chemistry* 9 (2): 111–17. <https://doi.org/10.1007/s40097-019-0301-1>.
- Gangapuram, Bhagavanth Reddy, Rajkumar Bandi, Madhusudhan Alle, Ramakrishna Dadigala, Girija Mangatayaru Kotu, and Veerabhadram Guttena. 2018. "Microwave Assisted Rapid Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Annona squamosa* L Peel Extract for the Efficient Catalytic Reduction of Organic Pollutants." *Journal of Molecular Structure* 1167: 305–15. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.004>.
- Gehr, Peter. 2018. "Interaction of Nanoparticles with Biological Systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (August): 395–99. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.023>
- Gour A. and Jain N. K. 2019. "Advances in green synthesis of nanoparticles." *Artificial cells, nanomedicine and biotechnology*. 47(1): 844-851. DOI:10.1080/21691401.2019.1577878
- Goutam, Surya Pratap, Gaurav Saxena, Varunika Singh, Anil Kumar Yadav, Ram Naresh Bharagava, and Khem B. Thapa.

2018. "Green Synthesis of TiO₂ Nanoparticles Using Leaf Extract of *Jatropha curcas* L. for Photocatalytic Degradation of Tannery Wastewater." *Chemical Engineering Journal* 336 (December 2017): 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.029>.
- Hamers, Robert J. 2017. "Nanomaterials and Global Sustainability." *Accounts of Chemical Research* 50 (3): 633–37. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00634>.
- He, Yangqing, Fenfei Wei, Zhanying Ma, Hao Zhang, Qian Yang, Binghua Yao, Zhengrui Huang, Jie Li, Cun Zeng, and Qian Zhang. 2017. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Seed Extract of: *Alpinia katsumadai*, and Their Antioxidant, Cytotoxicity, and Antibacterial Activities." *RSC Advances* 7 (63): 39842–51. <https://doi.org/10.1039/c7ra05286c>.
- Hernández-Morales, Liliana, Heriberto Espinoza-Gómez, Lucía Z. Flores-López, Erika Lis Sotelo-Barrera, Alfredo Núñez-Rivera, Rubén Darío Cadena-Nava, Gabriel Alonso-Núñez, and Karla Alejandra Espinoza. 2019. "Study of the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Natural Extract of Dark or White *Salvia hispanica* L. Seeds and Their Antibacterial Application." *Applied Surface Science* 489 (June): 952–61. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.06.031>.
- Hoseinpour, Vahid, and Nasser Ghaemi. 2018. "Green Synthesis of Manganese Nanoparticles: Applications and Future Perspective—A Review." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 189 (August): 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.022>.
- Hosny, Mohamed, Manal Fawzy, Yaser A. El-Badry, Enas E. Hussein, and Abdelazeem S. Eltaweil. 2022. "Plant-Assisted Synthesis of Gold Nanoparticles for Photocatalytic, Anticancer, and Antioxidant Applications." *Journal of Saudi Chemical Society* 26 (2): 101419. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101419>.
- Ibrar, Muhammad, Mir Azam Khan, Abdullah, and Muhammad Imran. 2018. "Evaluation of *Paeonia emodi* and Its Gold Nanoparticles for Cardioprotective and Antihyperlipidemic Potentials." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 189 (May): 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09.018>.
- Idrees, Muhammad, Saima Batool, Tanzila Kalsoom, Sadaf Raina, Hafiz Muhammad Adeel Sharif, and Summera Yasmeen. 2019. "Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Sida acuta* Extract for Antimicrobial Actions and Corrosion Inhibition Potential." *Environmental Technology (United Kingdom)* 40 (8): 1071–78. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1435738>.
- Irfan, Muhammad, Muhammad Moniruzzaman, Tausif Ahmad, Pradip Chandra Mandal, Sekhar Bhattacharjee, and Bawadi Abdullah. 2017. "Ionic Liquid Based Extraction of Flavonoids from *Elaeis guineensis* Leaves and Their Applications for Gold Nanoparticles Synthesis." *Journal of Molecular Liquids* 241: 270–78. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.151>.
- Jamkhande, Prasad Govindrao, Namrata W. Ghule, Abdul Haque Bamer, and Mohan G. Kalaskar. 2019. "Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and Applications." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53 (July 2018): 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
- Joshi, Neha, Neha Jain, Abhishek Pathak, Jai Singh, Ram Prasad, and Chandrama Prakash Upadhyaya. 2018. "Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Carissa carandas* Berries and Its Potential Antibacterial Activities." *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 86 (3): 682–89. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4666-2>.
- Kalimuthu, Kalishwaralal, Byung Seok Cha, Seokjoon Kim, and Ki Soo Park. 2020. "Eco-Friendly Synthesis and Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: A Review." *Microchemical Journal* 152 (September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104296>.
- Karak, Prithviraj. 2019. "BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW Prithviraj Karak Department of Physiology, Bankura Christian College, Bankura - 722101, West Bengal, India." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10 (4): 1567–74. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74).
- Katata-Seru, Lebogang, Tshepiso Moremedi, Oluwole Samuel Aremu, and Indra Bahadur. 2018. "Green Synthesis of Iron Nanoparticles Using *Moringa oleifera* Extracts and Their Applications: Removal of Nitrate from Water and Antibacterial Activity against *Escherichia coli*." *Journal of Molecular Liquids* 256: 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.093>.
- Khandanlou, Roshanak, Vinutha Murthy, and Hao Wang. 2020. "Gold Nanoparticle-Assisted Enhancement in Bioactive Properties of Australian Native Plant Extracts, *Tasmannia lanceolata* and *Backhousia citriodora*." *Materials Science and Engineering C* 112 (March): 110922. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110922>.
- Kobylnska, Natalia, Anatolij Shakhovskiy, Olena Khainakova, Dmytro Klymchuk, Liliya Avdeeva, Yakiv Ratushnyak, Volodymyr Duplij, and Nadiia Matvieieva. 2020. "'Hairy' Root Extracts as Source for 'Green' Synthesis of Silver Nanoparticles and Medical Applications." *RSC Advances* 10 (65): 39434–46. <https://doi.org/10.1039/d0ra07784d>.
- Kolahalam, Lalitha A., I. V. Kasi Viswanath, Bhagavathula S. Diwakar, B. Govindh, Venu Reddy, and Y. L.N. Murthy. 2019. "Review on Nanomaterials: Synthesis and Applications." *Materials Today: Proceedings* 18: 2182–90. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>.
- Lakshmanan, G., A. Sathiyaseelan, P. T. Kalaichelvan, and K. Murugesan. 2018. "Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using Fruit Extract of *Cleome viscosa* L.: Assessment of Their Antibacterial and Anticancer Activity." *Karala International Journal of Modern Science* 4 (1): 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.10.007>.
- Laouini, Salah Eddine, Abderrhmane Bouafia, Alexander V. Soldatov, Hamed Algarni, Mohammed Laid Tedjani, Gomaa A.M. Ali, and Ahmed Barhoum. 2021. "Green Synthesized of Ag/Ag₂O Nanoparticles Using Aqueous Leaves Extracts of *Phoenix dactylifera* L. And Their Azo Dye Photodegradation." *Membranes* 11 (7). <https://doi.org/10.3390/membranes11070468>.
- Lebaschi, Sadaf, Malak Hekmati, and Hojat Veisi. 2017. "Green Synthesis of Palladium Nanoparticles Mediated by Black Tea Leaves (*Camellia sinensis*) Extract: Catalytic Activity in the Reduction of 4-Nitrophenol and Suzuki-Miyaura Coupling Reaction under Ligand-Free Conditions." *Journal of Colloid and Interface Science* 485: 223–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.027>.
- Lembang, M. S., Y. Yulizar, S. Sudirman, and D. O.B. Apriandanu. 2018. "A Facile Method for Green Synthesis of Nd₂O₃ Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Terminalia catappa* Leaf." *AIP Conference Proceedings* 2023 (October 2018): 1–7. <https://doi.org/10.1063/1.5064090>.

- Li, Hongyan, Dandan Liu, Shenghui Li, and Changhu Xue. 2019. "Synthesis and Cytotoxicity of Selenium Nanoparticles Stabilized by α -D-Glucan from *Castanea mollissima* Blume." *International Journal of Biological Macromolecules* 129: 818–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.085>.
- Ma, Yihua, Congyan Liu, Ding Qu, Yan Chen, Mengmeng Huang, and Yuping Liu. 2017. "Antibacterial Evaluation of Silver Nanoparticles Synthesized by Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* Roots." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 89: 351–57. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.009>.
- Mahendiran, D., G. Subash, D. Arumai Selvan, Dilaveez Rehana, R. Senthil Kumar, and A. Kalilur Rahiman. 2017. "Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Extracts of *Aloe vera* and *Hibiscus sabdariffa*: Phytochemical, Antibacterial, Antioxidant and Anti-Proliferative Studies." *BioNanoScience* 7 (3): 530–45. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0418-y>.
- Mahiuddin Md., Saha P and Ochiai B. 2020. "Green Synthesis and Catalytic Activity of Silver Nanoparticles Based on *Piper chaba* Stem Extracts." *Nanomaterials* 10: 1777. doi:10.3390/nano10091777
- Malapermal, Veshara, Izel Botha, Suresh Babu Naidu Krishna, and Joyce Nonhlanhla Mbatha. 2017. "Enhancing Antidiabetic and Antimicrobial Performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) Using Silver Nanoparticles." *Saudi Journal of Biological Sciences* 24 (6): 1294–1305. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.026>.
- Malek Mohammadi F. and Ghasemi N. 2018. "Influence of Temperature and Concentration on Biosynthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles using *Cherry* Extract." *Journal of Nanostructure in Chemistry* 8: 93-102. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0257-6>
- Marsh K. and Bugusu B. 2007. "Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues." *Journal of food science* 72(3): R39-R55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Mateus, Gustavo Affonso Pisano, Michele Putti Paludo, Tássia Rhuna Tonial Dos Santos, Marcela Fernandes Silva, Leticia Nishi, Márcia Regina Fagundes-Klen, Raquel Guttieres Gomes, and Rosângela Bergamasco. 2018. "Obtaining Drinking Water Using a Magnetic Coagulant Composed of Magnetite Nanoparticles Functionalized with *Moringa oleifera* Seed Extract." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6 (4): 4084–92. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.050>.
- Matinise, N., K. Kaviyarasu, N. Mongwaketsi, S. Khamlich, L. Kotsedi, N. Mayedwa, and M. Maaza. 2018. "Green Synthesis of Novel Zinc Iron Oxide ($ZnFe_2O_4$) Nanocomposite via *Moringa oleifera* Natural Extract for Electrochemical Applications." *Applied Surface Science* 446: 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.187>.
- Mayedwa, Noluthando, Nametso Mongwaketsi, Saleh Khamlich, Kasinathan Kaviyarasu, Nolubabalo Matinise, and Malik Maaza. 2018. "Green Synthesis of Nickel Oxide, Palladium and Palladium Oxide Synthesized via *Aspalathus linearis* Natural Extracts: Physical Properties & Mechanism of Formation." *Applied Surface Science* 446: 266–72. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.116>.
- Mena-García, A., A. I. Ruiz-Matute, A. C. Soria, and M. L. Sanz. 2019. "Green Techniques for Extraction of Bioactive Carbohydrates." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 119: 115612. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.023>.
- Mera, Irina Francesca González, Daniela Estefanía González Falconí, and Vivian Morera Córdova. 2019. "Secondary Metabolites in Plants: Main Classes, Phytochemical Analysis and Pharmacological Activities." *Revista Bionatura* 4 (4). <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11>.
- Mody, VickyV, Rodney Siwale, Ajay Singh, and HardikR Mody. 2010. "Introduction to Metallic Nanoparticles." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2 (4): 282. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>.
- Mohamad Sukri, Siti Nur Amalina, Kamyar Shameli, Magdelyn Mei-Theng Wong, Sin Yeang Teow, Jactty Chew, and Nur Afni Ismail. 2019. "Cytotoxicity and Antibacterial Activities of Plant-Mediated Synthesized Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using *Punica granatum* (Pomegranate) Fruit Peels Extract." *Journal of Molecular Structure* 1189: 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.026>.
- Mohanan, Akhilash, Vishnu Sankar, Abbas Rahdar, Jithu Joseph, Fardin Sadeghfar, Ronaldo Anuf A, K Rajesh, and George Z Kyzas. 2020. "Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles with Antibacterial and Antifungal Activity." *Journal of Molecular Structure* 1211: 128107. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128107>.
- Mora, Marc, Andrew Stannard, and Sergi Garcia-Manyes. 2020. "The Nanomechanics of Individual Proteins." *Chemical Society Reviews* 49 (19): 6816–32. <https://doi.org/10.1039/d0cs00426j>.
- Mourdikoudis S., Pallares R. M. and Thanh T. K. 2018. "Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementary upon studying nanoparticle properties." *Nanoscale* 10 12871-12934. DOI: 10.1039/c8nr02278
- Nabi, Ghulam, Qurat Ul Ain, M. Bilal Tahir, Khalid Nadeem Riaz, Tahir Iqbal, Muhammad Rafique, Sajad Hussain, Waseem Raza, Imran Aslam, and Muhammad Rizwan. 2022. "Green Synthesis of TiO₂ Nanoparticles Using Lemon Peel Extract: Their Optical and Photocatalytic Properties." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 102 (2): 434–42. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1722816>.
- Naga, Panduranga, Vijay Kumar, Shameem Ummey, and Lakshmi Kalyani. 2018. "Microbial Pathogenesis Ultra Small, Mono Dispersed Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Sida cordifolia* Plant and Investigation of Antibacterial Activity." *Microbial Pathogenesis* 124 (December 2017): 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.026>.
- Naikoo, Gowhar A., Mujahid Mustaqeem, Israr U. Hassan, Tasbiha Awan, Fareeha Arshad, Hiba Salim, and Ahsanulhaq Qurashi. 2021. "Bioinspired and Green Synthesis of Nanoparticles from Plant Extracts with Antiviral and Antimicrobial Properties: A Critical Review." *Journal of Saudi Chemical Society* 25 (9): 101304. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101304>.
- Narendra Kumar, H. K., N. Chandra Mohana, B. R. Nuthan, K. P. Ramesha, D. Rakshith, N. Geetha, and Sreedharamurthy Satish. 2019. "Phyto-Mediated Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Plant Extract of *Ocimum americanum* and Evaluation of Its Bioactivity." *SN Applied Sciences* 1 (6): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0671-5>.
- Nguyen, Dai Hai, Jung Seok Lee, Ki Dong Park, Yern Chee Ching, Xuan Thi Nguyen, V H Giang Phan, Thai Thanh, and Hoang Thi. n.d. "Green Silver Nanoparticles Formed by *Phyllanthus urinaria*, *Pouzolzia zeylanica*, and *Scoparia dulcis* Leaf Extracts and the Antifungal Activity."

- Nguyen, Duyen Thi Cam, Huy Hoang Dang, Dai Viet N. Vo, Long Giang Bach, Trinh Duy Nguyen, and Thuan Van Tran. 2021. "Biogenic Synthesis of MgO Nanoparticles from Different Extracts (Flower, Bark, Leaf) of *Tecoma stans* (L.) and Their Utilization in Selected Organic Dyes Treatment." *Journal of Hazardous Materials* 404 (PA): 124146. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124146>.
- Opris, Razvan, Corina Tatomir, Diana Olteanu, Remus Moldovan, Bianca Moldovan, Luminita David, Andras Nagy, Nicoleta Decea, Mihai Ludovic Kiss, and Gabriela Adriana Filip. 2017. "The Effect of *Sambucus nigra* L. Extract and Phytosynthesized Gold Nanoparticles on Diabetic Rats." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 150: 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.033>.
- Ovais, Muhammad, Ali Talha Khalil, Nazar Ul Islam, Irshad Ahmad, Muhamamd Ayaz, Muthupandian Saravanan, Zabta Khan Shinwari, and Sudip Mukherjee. 2018. "Role of Plant Phytochemicals and Microbial Enzymes in Biosynthesis of Metallic Nanoparticles." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (16): 6799–6814. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9146-7>.
- P., Patil Shriniwas, and Kumbhar Subhash T. 2017a. "Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles Synthesized Using Terpenes Rich Extract of *Lantana camara* L. Leaves." *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (October 2016): 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.002>.
- Pei, Junwen, Binfan Fu, Lifeng Jiang, and Taizhen Sun. 2019. "Biosynthesis, Characterization, and Anticancer Effect of Plant-Mediated Silver Nanoparticles Using *Coptis chinensis*." *International Journal of Nanomedicine* 14: 1969–78. <https://doi.org/10.2147/IJN.S188235>.
- Proshkina, Ekaterina, Sergey Plyusnin, Tatyana Babak, Ekaterina Lashmanova, Faniya Maganova, Liubov Koval, Elena Platonova, Mikhail Shaposhnikov, and Alexey Moskalev. 2020. "Terpenoids as Potential Geroprotectors." *Antioxidants* 9 (6): 1–51. <https://doi.org/10.3390/antiox9060529>.
- Rafi Shaik, Mohammed, Zuhur Jameel Qandeel Ali, Mujeeb Khan, Mufsir Kuniyil, Mohamed E. Assal, Hamad Z. Alkathlan, Abdulrahman Al-Warthan, Mohammed Rafiq H. Siddiqui, Merajuddin Khan, and Syed Farooq Adil. 2017. "Green Synthesis and Characterization of Palladium Nanoparticles Using *Origanum vulgare* L. Extract and Their Catalytic Activity." *Molecules* 22 (1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010165>.
- Rafique, Muhammad, Rabbia Tahir, S. S.A. Gillani, M. Bilal Tahir, M. Shakil, T. Iqbal, and M. O. Abdellahi. 2022. "Plant-Mediated Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from *Syzygium cumini* for Seed Germination and Wastewater Purification." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 102 (1): 23–38. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1715379>.
- Raheema, Rana Hussein, and Roaa M H Shoker. 2020. "Phytochemicals Screening and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles, Phenols and Alkaloids Extracts of *Conocarpus lancifolius*." *EurAsian Journal of BioSciences Eurasia J Biosci* 14 (October): 4829–35.
- Rehana, Dilaveez, D. Mahendiran, R. Senthil Kumar, and A. Kalilir Rahiman. 2017. "Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of Copper Oxide Nanoparticles Synthesized Using Medicinally Important Plant Extracts." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 89: 1067–77. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.101>.
- Rios, J. L., S. Simeon, and A. Villar. 1989. "Pharmacological Activity of Aporphinoid Alkaloids. A Review." *Fitoterapia* 60 (5): 387–412. <https://doi.org/10.63019/ajb.v1i2.467>.
- Roduner, Emil. 2006. "Size Matters: Why Nanomaterials Are Different." *Chemical Society Reviews* 35 (7): 583–92. <https://doi.org/10.1039/b502142c>.
- Rostamizadeh, Elham, Alireza Iranbakhsh, Ahmad Majd, Sedigheh Arbabian, and Iraj Mehregan. 2020. "Green Synthesis of Fe₂O₃ Nanoparticles Using Fruit Extract of *Cornus mas* L. and Its Growth-Promoting Roles in Barley." *Journal of Nanostructure in Chemistry* 10 (2): 125–30. <https://doi.org/10.1007/s40097-020-00335-z>.
- Samari, Fayeze, Hossein Salehipoor, Ebrahim Eftekhari, and Saeed Yousefinejad. 2018. "Low-Temperature Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Mango Leaf Extract: Catalytic Effect, Antioxidant Properties, Anticancer Activity and Application for Colorimetric Sensing." *New Journal of Chemistry* 42 (19): 15905–16. <https://doi.org/10.1039/C8NJ03156H>.
- Santhoshkumar, R., A. Hima Parvathy, and E. V. Soniya. 2021. "Phytosynthesis of Silver Nanoparticles from Aqueous Leaf Extracts of *Piper colubrinum*: Characterisation and Catalytic Activity." *Journal of Experimental Nanoscience* 16 (1): 295–309. <https://doi.org/10.1080/17458080.2021.1970140>.
- Sharma, Vikrant, Sulochana Kaushik, Pooja Pandit, Divya Dhull, Jaya Parkash Yadav, and Samander Kaushik. 2019. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Medicinal Plants and Evaluation of Their Antiviral Potential against Chikungunya Virus." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (2): 881–91. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9488-1>.
- Sherin, Lubna, Ayesha Sohail, Um e.Salma Amjad, Maria Mustafa, Riffat Jabeen, and Anwar Ul-Hamid. 2020. "Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Terminalia bellerica* Kernel Extract for Catalytic Reduction of Anthropogenic Water Pollutants." *Colloids and Interface Science Communications* 37 (May): 100276. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100276>.
- Silva, Anderson Felipe Viana da, Ana Paula Fagundes, Domingos Lusitâneo Pier Macuvelo, Elita Fontanele Urano de Carvalho, Michelangelo Durazzo, Natan Padoin, Cíntia Soares, and Humberto Gracher Riella. 2019. "Green Synthesis of Zirconia Nanoparticles Based on *Euclea natalensis* Plant Extract: Optimization of Reaction Conditions and Evaluation of Adsorptive Properties." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 583 (August): 123915. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123915>.
- Singh, Hina, Juan Du, Priyanka Singh, and Tae Hoo Yi. 2018. "Ecofriendly Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by *Euphrasia officinalis* Leaf Extract and Its Biomedical Applications." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46 (6): 1163–70. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1362417>.
- Singh, Jagpreet, Tanushree Dutta, Ki Hyun Kim, Mohit Rawat, Pallabi Samddar, and Pawan Kumar. 2018. "'Green' Synthesis of Metals and Their Oxide Nanoparticles: Applications for Environmental Remediation." *Journal of Nanobiotechnology* 16 (1): 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>.
- Skandalis, Nicholas, Anastasia Dimopoulou, Anthie Georgopoulou, Nikolaos Gallios, Dimitrios Papadopoulos, Dimitrios Tsipas, Ioannis Theologidis, Nikolaos Michailidis, and Maria Chatzinikolaïdou. 2017. "The Effect of Silver

- Nanoparticles Size, Produced Using Plant Extract from *Arbutus Unedo*, on Their Antibacterial Efficacy." *Nanomaterials* 7 (7). <https://doi.org/10.3390/nano7070178>.
- Swathi, Vottikuti, Maravajhala Vidyavathi, T. N.V.K.V. Prasad, and R. V.Suresh Kumar. 2013. "Comparison of Different Nano Biocomposites of Neomycin with Marketed Ointment by In-Vitro and in-Vivo Evaluations." *International Journal of Drug Delivery* 5 (4): 438–48. <https://doi.org/10.5138/ijdd.v5i4.1171>.
- Taylor, Alicia A., M. Yusuf Khan, Jennifer Helbley, and Sharon L. Walker. 2017. "Safety Evaluation of Hair-Dryers Marketed as Emitting Nano Silver Particles." *Safety Science* 93: 121–26. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2016.11.021>.
- Tiwari, Nikita, Raksha Pandit, Swapnil Gaikwad, Aniket Gade, and Mahendra Rai. 2017. "Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by Petals Extract of *Rosa Indica* L., Its Formulation as Nail Paint and Evaluation of Antifungal Activity against Fungi Causing *onychomycosis*." *IET Nanobiotechnology* 11 (2): 205–11. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0003>.
- Tolman, C. A. 1972. "The 16 and 18 Electron Rule in Organometallic Chemistry and Homogeneous Catalysis." *Chemical Society Reviews* 1 (3): 337–53. <https://doi.org/10.1039/CS9720100337>.
- Tripathi, Deepika, Arusha Modi, Gopeshwar Narayan, and Shashi Pandey Rai. 2019. "Green and Cost Effective Synthesis of Silver Nanoparticles from Endangered Medicinal Plant *Withania coagulans* and Their Potential Biomedical Properties." *Materials Science and Engineering C* 100 (February): 152–64. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.113>.
- Vance, Marina E., Todd Kuiken, Eric P. Vejerano, Sean P. McGinnis, Michael F. Hochella, and David Rejeski Hull. 2015. "Nanotechnology in the Real World: Redeveloping the Nanomaterial Consumer Products Inventory." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6 (1): 1769–80. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.
- Veisi, Hojat, Bikash Karmakar, Taiebeh Tamoradi, Saba Hemmati, Malak Hekmati, and Mona Hamelian. 2021. "Biosynthesis of CuO Nanoparticles Using Aqueous Extract of Herbal Tea (*Stachys lavandulifolia*) Flowers and Evaluation of Its Catalytic Activity." *Scientific Reports* 11 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81320-6>.
- Vijayakumar, S., P. Arulmozhi, N. Kumar, B. Sakthivel, S. Prathip Kumar, and P. K. Praseetha. 2019. "*Acalypha Fruticosa* L. Leaf Extract Mediated Synthesis of ZnO Nanoparticles: Characterization and Antimicrobial Activities." *Materials Today: Proceedings* 23: 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.660>.
- Vijayakumar, S., S. Mahadevan, P. Arulmozhi, S. Sriram, and P. K. Praseetha. 2018. "Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Atalantia monophylla* Leaf Extracts: Characterization and Antimicrobial Analysis." *Materials Science in Semiconductor Processing* 82 (November 2017): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2018.03.017>.
- Wang, Lu, Yanan Wu, Jia Xie, Sheng Wu, and Zhenqiang Wu. 2018. "Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Green Synthesized Silver Nanoparticles from *Psidium guajava* L. Leaf Aqueous Extracts." *Materials Science and Engineering C* 86 (February): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.003>.
- Widatalla, Hiba Abbas, Layla Fathi Yassin, Ayat Ahmed Alrasheid, Shima Abdel Rahman Ahmed, Marvit Osman Widdatallah, Sahar Hussein Eltilib, and Alaa Abdulmoneim Mohamed. 2022. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Green Tea Leaf Extract, Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity." *Nanoscale Advances* 4: 911–15. <https://doi.org/10.1039/d1na00509j>.
- Yousaf, Huma, Ansar Mehmood, Khawaja Shafique Ahmad, and Muhammad Raffi. 2020. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications as an Alternative Antibacterial and Antioxidant Agents." *Materials Science and Engineering C* 112 (February): 110901. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110901>.



Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in slaughtered broiler chickens in Paraguay

Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en pollos parrilleros de una planta frigorífica en Paraguay

Liz Aurora Castro Rojas^{1*}✉, Jonatan M. Del Solar-Velarde², Natalie Weiler³, Veronica Orrego³, Diego Sosa-Argaña⁴, Fredi L. Álvarez⁵.

¹ Departamento de Genética y Zootecnia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

² Animal Science Department, Center for Agrarian Sciences, Federal University of Sergipe (UFS), São Cristovão, Sergipe, Brazil.

³ Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

⁴ Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

⁵ Departamento de Clínicas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

ABSTRACT

Campylobacteriosis is one of the main zoonotic diseases transmitted through food, particularly chicken meat and its derivatives, which are relevant sources of transmission to humans. This study aimed to ascertain both prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Cobb 500™ broiler chickens from a slaughterhouse in Paraguay. From 300 cloacal swab samples collected randomly, microbiological analysis were performed followed by bacterial confirmation through molecular polymerase chain reaction (PCR). *Campylobacter spp.* prevalence was 63.6 %, with 97.3 % corresponding to *C. jejuni* and 2.7 % to *C. coli*. Bacterial susceptibility to ciprofloxacin and erythromycin was determined using the E-test®. Resistance to ciprofloxacin was observed in 85 % of *C. jejuni* and in 100 % of *C. coli* isolates. Erythromycin resistance was identified in only one *C. jejuni* isolate (0.5 %). This research highlights the significance of *C. jejuni* prevalence and resistance to ciprofloxacin. These findings underscore the public health risk associated with chicken meat consumption, possibly containing antibiotic-resistant *Campylobacter* species. Hence, the necessity of implementing health control measures, concerning antibiotic treatments in poultry production can be emphasized.

Keywords: Poultry, antimicrobials, *Campylobacter spp.*, food pathogens, PCR, public health.

RESUMEN

La campylobacteriosis es una de las principales enfermedades zoonóticas transmitidas por los alimentos, en particular la carne de pollos parrilleros y sus derivados, representando fuentes importantes de transmisión a los humanos. Esta investigación tuvo como objetivo verificar la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Cam-*

pylobacter coli en pollos parrilleros Cobb 500™ de una planta frigorífica en Paraguay. A partir de 300 muestras de hisopado cloacal colectadas aleatoriamente, fueron realizados análisis microbiológico seguido de confirmación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La prevalencia *Campylobacter spp.* fue de 63.6 %, con 97.3 % correspondiente a *C. jejuni* y 2.7 % a *C. coli*. La susceptibilidad antimicrobiana a la ciprofloxacina y eritromicina fue determinada por E-test®. La resistencia a la ciprofloxacina fue de 85 % en aislados de *C. jejuni* y en 100 % de *C. coli*. La resistencia para la eritromicina fue encontrada en un aislado de *C. jejuni* (0.5 %). Este trabajo alerta valores relevantes de resistencia a la ciprofloxacina y de alta prevalencia de *C. jejuni*. Estos resultados informan el riesgo que representa, para la salud pública, el consumo de carne de pollos parrilleros contaminada con especies de *Campylobacter* resistentes a antibióticos. Por lo tanto, puede ser enfatizada la necesidad de implementar medidas de control sobre la utilización de antibióticos en la producción avícola.

Palabras clave: avicultura, *Campylobacter spp.*, patógenos de alimentos, PCR, salud pública.

INTRODUCTION

Poultry industry represents one of the primary sectors in the Paraguayan economy, with an exponential growth in the number of poultry farms dedicated to broiler chickens production (Rojas *et al.*, 2010). This is directly related to the increase of local poultry meat consumption, which is even higher than that of beef and pork (USAID, 2010). However, technological advances have intensified exploitation systems, favoring proliferation and dissemination of crucial pathogens for public health, with birds as important reservoirs of zoonotic microorganisms. In poultry production, antimicrobial agents are massively used, not only as growth promoters but also for diseases prevention and control (Zendehbad *et al.*, 2015).

*Author for correspondence: Liz Aurora Castro Rojas
 e-mail: lcastro@vet.una.py

Received: April 24, 2022

Accepted: August 28, 2023

Published: October 13, 2023

Campylobacteriosis is recognized as one of the most important gastric diseases in the world, characterized by diarrhoea, abdominal pain and fever in humans (Hungaro *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Borck *et al.*, 2016; Seliworstow *et al.*, 2016). This disease is produced by thermophilic bacteria of the genus *Campylobacter*, among which *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* are the most associated species with frequent humans infection (Prachantasena *et al.*, 2016). In broilers, scientific evidence have shown that campylobacteriosis prevalence is very high, reaching over 70 % (Saleha, 2002; Hue *et al.*, 2011; Saiyudthong *et al.*, 2015). However, some countries such as Italy, China, Czech Republic and Brazil reported lower prevalence values, between 32.7 and 63.1 % (Bardon *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Giacomelli *et al.*, 2012; Zendeabad *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). In this context, contaminated chicken meat represents the main transmission source for Campylobacteriosis to humans (Robyn *et al.*, 2015; Abu-Madi *et al.*, 2016).

Besides this, antibiotics are used in poultry for campylobacteriosis treatment, including macrolides and fluoroquinolones, such as erythromycin and ciprofloxacin, respectively (Payot *et al.*, 2006). However, literature has demonstrated antimicrobial resistance to ciprofloxacin, tetracycline, nalidixic acid in some *Campylobacter* strains, fact that implies real sanitary risks to human health (Jamali *et al.*, 2015; Wiczorek *et al.*, 2015). Furthermore, antibiotic resistance in humans has been also observed. The literature argue that antibiotic resistance behaviour is linked with high campylobacteriosis prevalence in poultry farms, making the human population vulnerable due to the increased chicken meat consumption (Mäesaar *et al.*, 2016). Thus, the objective of this study was to verify the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in broilers from the Central Department of Paraguay and to evaluate their antimicrobial susceptibility to ciprofloxacin and erythromycin.

MATERIAL AND METHODS

Fecal samples collection and management

Cloacal swabs samples in chicken broilers was carried out with non-invasive procedures, without entering the birds' body cavity, at the slaughter installations. All the prevailing local, national and international regulations and conventions, as well as normal scientific ethical practices, were respected.

A total of 300 samples of cloacal swabs from Cobb 500™ broiler chickens of approximately 38 to 41 days of life were randomly collected. The samples were obtained from six different slaughter lots of a cold storage chamber located in Paraguay. Feces were collected before slaughter using sterile cotton swabs and transported in Cary-Blair medium (Oxoid, Dardilly, France).

Campylobacter spp. isolation and identification

Cloacal swabs samples were analyzed at the Laboratorio de Diagnóstico de los Animales Domésticos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción. Bacterial culture consisted in direct sowing the swabs samples in *Campylobacter* Agar Preston enrichment medium

(Oxoid, Basingstoke, UK), and then incubated in microaerophilic atmosphere with commercial CampyGen™ kit (Oxoid, Basingstoke, UK) at 42 °C during 48 h. Suspected colonies were collected on base blood agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at 42 °C for 24 h. After incubation, petri dishes were examined for identification of *Campylobacter* spp (Silva *et al.*, 2016). Identification at species level was performed by catalase test, indoxyl acetate hydrolysis, hippurate hydrolysis, and susceptibility to nalidixic acid and cephalothin (Ingrisa-Capaccioni *et al.*, 2015) and then confirmed by multiplex PCR (WHO, 2007).

DNA extraction for *Campylobacter* spp. identification and PCR conditions

Genomic DNA was extracted using a modified protocol of bacterial cell lysis, according to Giacomelli *et al.* (2012). The reaction mixture conformed the final volume of 25 µL, containing 2.5 µL Buffer (50 mM Tris-HCl 10X), 1 µL Cl₂Mg (50 mM), 2 µL of each dNTP (2.5 mM), 2.5 µL of each primer (10 µM), 0.25 µL of Taq polymerase (5U / µL Invitrogen™, USA), 4.25 µL of molecular quality water and 5 µL template DNA (100 ng/µL). The oligonucleotide sequence of each primer was previously described by Vandamme *et al.* (1997), for *Campylobacter* spp. identification, as shown in Table 1.

Bacterial DNA was amplified in a C1000™ thermocycler (BIO-RAD, Singapore) with the following amplification conditions: Initial denaturation of 94 °C during for minutes, eight cycles of one minute at 94 °C, with a decreasing gradient of 2 °C every two cycles, beginning with 64 °C and 72 °C; followed by 30 cycles at 94 °C, 54 °C and 72 °C for 1 min and a final extension stage at 72°C for 10 min (WHO, 2007).

Therefore, PCR products were separated by electrophoresis in 2 % agarose gel at 100 V and 400 mA for 40 min, in Tris-Acetate-EDTA (TAE 1X), and stained with ethidium bromide to be visualized on Digidoc-It® Imaging System (UVP, Canada). The reference strains used were *C. jejuni* ATCC 29428 and *C. coli* ATCC 33559.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimal inhibitory concentration (MIC) to ciprofloxacin and erythromycin were assessed by E-test® (AB Biodisk, Sweden) using Mueller-Hinton agar, under microaerophilic

Table 1. Primers used in the polymerase chain reaction (PCR) to identify *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in fecal samples from slaughtered broiler chickens in Paraguay.

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en muestras fecales de pollos parrilleros en Paraguay.

Target species	Target gene ^a	Primer sequence (5' → 3')	Product size (bp)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Random	F: CA TCT TCC CTA GTC AAG CCT R: AAG ATA TGG CTC TAG CAA GAC	773
<i>Campylobacter coli</i>	Random	F: AG GCA AGG GAG CCT TTA ATC R: TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC	364

^aAssay performed as a multiplex reaction for detection of both *C. jejuni* and *C. coli*. F=Forward; R= Reverse

atmosphere at 37 °C during 48 h (Albert, 2013), at the Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. The cut-off points were interpreted according to CLSI M45-2 document (CLSI, 2012), where MIC of ≤ 8 is considered as sensitive, 16 as intermediate and ≥ 32 as resistant strain for Erythromycin; and for Ciprofloxacin, when ≤ 1 is considered as sensitive, 2 as intermediate and ≥ 4 as resistant strain. *C. jejuni* ATCC 29428 strains were included in the experimental assay for quality control.

Statistical analyses

To investigate *C. jejuni* and *C. coli* prevalence in different batches of Cobb 500™ broiler chickens, non-parametric ANOVA with sensitive and resistant samples was used within each batch. The samples in each batch, ractor considered as fixed effect, were used to asses differences between possitive (1) and negative (0) percentages for *Campylobacter spp.* trough a generalized linear model (GLM) with binomial distribution. Each sample was considered as random effect. Statistical analyses were executed using R (R Core Team, 2016) with lme4 package (Bates *et al.*, 2015) considering 5 % of significance level (p < 0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 shows the absolute frequencies of *Campylobacter spp.* found in the current study. From the 300 samples, 191 (63.6 %) were positive for *Campylobacter spp.*, 186 (97.3 %) of which corresponded to *C. jejuni* and 5 (2.7 %) to *C. coli*. Furthermore, Figure 1 evidence the electrophoresis gel from *C. jejuni* and *C. coli*, as result from PCR identification.

Particulary, the differences between *C. jejuni* and *C. coli* prevalence values, could be related to the fact that poultry chicken are hosts of *C. jejuni* and that they serve as a reservoir for this pathogen (Sahin *et al.*, 2002; Lee and Newell, 2006) and, there is evidence for the season of the year influencing *C. jejuni* and *C. coli* sprouts, resulting in largest numbers of *C. jejuni* cases in spring (Wieczorek *et al.*, 2020), coinciding with the results of the current work, considering that the samples were obtained from October to December (spring), therefore, the largest cases of *C. coli* are present in autumn.

Prevalence studies were developed in countries with relevant meat produciton from poultry farming. In commercial broiler chickens production from Brazil, Malaysia, and the United Kingdom, high *Campylobacter spp.* prevalence were found, ranging from 58 to 95 % in fecal samples (Saleha, 2002; Yew *et al.*, 2010; Colles *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016). In the same context, Italy and Spain commercial broiler chicken produciton showed prevalence values between 65 to 61.9 %, respectively (Giacomelli *et al.*, 2012; Ingesa-Capaccioni *et al.*, 2015), which are similar to those found in this research. Other studies showed lower values found in samples of cecal content (37.1 and 35.9 %), meat (18.9 %) and broiler carcasses (16.8 %) (Chen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Mäesaar *et al.*, 2016). These differences can be attributed to the type of sample, bacterial isolation procedures, DNA extraction methods, primers sequences used for PCR, management practices or broiler chickens age sampled.

At species level, this research verified that *C. jejuni* prevalence was higher than *C. coli*. The same relation has been widely described (Bardon *et al.*, 2009; Hungaro *et al.*, 2015;

Table 2. Frequency (n) and percentage (%) of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* prevalence found by polymerase chain reaction (PCR), from fecal samples of slaughtered broiler chickens in Paraguay (N = 300).

Tabla 2. Frecuencia (n) y porcentaje (%) de la prevalencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, determinada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de muestras fecales de pollos parrilleros en Paraguay (N= 300).

Batch	N	Samples		<i>Campylobacter</i>	
		Positive	Negative	<i>jejuni</i>	<i>coli</i>
A	50	42 (84.0)	8 (16.0)	42 (100.0)	/
B	50	40 (80.0)	10 (20.0)	40 (100.0)	/
C	50	15 (30.0)	35 (70.0)	15 (100.0)	/
D	50	26 (52.0)	24 (48.0)	25 (96.2)	1 (3.8)
E	50	40 (80.0)	10 (40.0)	39 (97.5)	1 (2.5)
F	50	28 (56.0)	22 (44.0)	25 (89.2)	3 (10.8)
Total	300	191 (63.6)	119 (36.4)	186 (97.3)	5 (2.7)

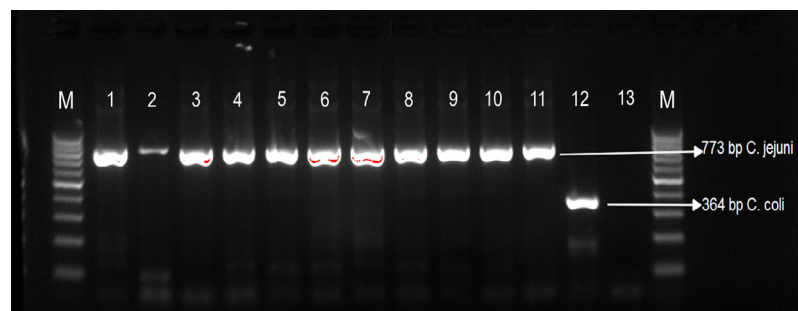


Figure 1. PCR agarose electrophoresis gel of bacterial DNA samples from fecal samples, obtained in slaughtered broiler chickens in Paraguay. Lane M: 100 bp molecular weight marker. Lanes 1 to 10: *Campylobacter jejuni* positive samples. Lane 11: *Campylobacter jejuni* positive control. Lane 12: *Campylobacter coli* positive control. Lane 13: Negative control.

Figura 1. Gel de electroforesis en agarosa de PCR a partir de DNA bacteriano de muestras fecales, obtenidas de pollos parrilleros en Paraguay. Carril M: Marcador de tamaño molecular de 100 bp. Carriles 1 a 10: Muestras positivas a *Campylobacter jejuni*. Carril 11: Control positivo de *Campylobacter jejuni*. Carril 12: Control positivo de *Campylobacter coli*. Carril 13: Control negativo.

Saiyudthong *et al.*, 2015; Mäesaar *et al.*, 2016). In contrast, Wang *et al.* (2016) found percentages of *C. coli* positive samples in broiler chickens, slightly higher when compared to *C. jejuni* in the same samples; as well as in commercial pigs with 98.7 % for *C. coli* and 1.2 % for *C. jejuni*. In studies developed in human faecal samples, *C. jejuni* prevalence was higher than *C. coli* (Thakur *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2011; Tamborini *et al.*, 2012; Quetz *et al.*, 2016).

The present work found a high antimicrobial resistance to ciprofloxacin (85 %) while resistance to erythromycin was very low (0.5 %) ($p < 0.05$). (Table 3).

In broiler chickens, there is scientific evidence showing resistance to ciprofloxacin, with values ranging from 60.2 to 99.5 % in *C. jejuni* and 44.4 % to 100 % in *C. coli*; and to erythromycin, with values ranging from 1 % to 98.3 % in *C. jejuni* and 33.3 to 100 % in *C. coli* (Bardon *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Yew *et al.*, 2010; Zendeabad *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Mäesaar *et al.*, 2016). The main cause of the high *C. jejuni* ciprofloxacin resistance in the present study could be due to genetic and environmental effects. On one hand, *C. jejuni* does not have one of the main action target sites of Topoisomerase IV, due to a punctual gene mutation, allowing it to show high resistance to ciprofloxacin; and also, it could be related to the indiscriminate use of antimicrobials in poultry industry (Orrego *et al.*, 2014). Furthermore, one of the batches sampled in the present research, batch A, showed *C. jejuni* isolates with similar percentage between sensitive and resistant strains ($p > 0,05$), provably due to the slaughter of animals with less antibiomatic use as growing promoter when compared to the other batches, with more than 90 % of the samples resistant to ciprofloxacin ($p < 0,05$), fact that could be related to the massive use of this antibiotic, aiming to treat and prevent of diseases, as well as growth promoters in broiler chickens commercial production (McDermott *et al.*, 2002; Gouvêa *et al.*, 2015)

In *C. jejuni* isolates of human origin, resistance to ciprofloxacin have been found to be between 68 % and 65 % (Tamborini *et al.*, 2012; Mäesaar *et al.*, 2016). Increased resistance to erythromycin, ciprofloxacin and tetracyclines has also been found in isolates from patients with diarrhoea, limi-

ting their use for health treatment in humans (Albert, 2013). This is important for public health, since these antibiotics are commonly used for humans campylobacteriosis treatment (Wieczorek *et al.*, 2015). In the present study, a single *C. jejuni* isolate was found to be resistant to both antibiotics. Several authors have described antibiotic multiresistance of *C. coli* when compared to *C. jejuni*, probably due to the intrinsic capacity of the microorganism to develop resistance to antibiotics (Zhao *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010), which was not observed in the present work, possibly due to the standardized poultry management in broiler chicken farms from Paraguay, sharing similar animal and antibiotic handling and production patterns.

CONCLUSIONS

This research demonstrated the presence of thermotolerant *Campylobacter* species, mainly *C. jejuni* and *C. coli*, in cloacal swabs from broiler chickens. The isolates studied showed high *C. jejuni* resistance to ciprofloxacin. This work provides unprecedented information on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species from a slaughtered broiler chickens of Paraguay.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare they have no conflicts of interest with regard to the work presented in this report.

REFERENCES

- Albert, M.J. 2013. In vitro susceptibility of *Campylobacter jejuni* from Kuwait to tigecycline & other antimicrobial agents. *Indian J Med Res.* 137: 187–190.
- Abu-Madi, M., Behnke, J.M., Sharma, A. and Al-Banna, N. 2016. Prevalence of Virulence/Stress Genes in *Campylobacter jejuni* from Chicken Meat Sold in Qatari Retail Outlets. *PLoS One.* 11: e0156938.
- Bardon, J., Kolar, M., Cekanova, L., Hejnar, P. and Koukalova, D. 2009. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its Resistance to Antibiotics in Poultry in the Czech Republic. *Zoonoses Public Health.* 56: 111–116.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, and Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw.* 2015;67(1):1–48. <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

Table 3. Frequency (n) and percentage (%) of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* antimicrobial susceptibility, obtained from fecal samples of slaughtered broiler chickens in Paraguay (N = 191).

Tabla 3. Frecuencia (n) y porcentaje (%) de susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, obtenida de muestras fecales de pollos parrilleros en Paraguay (N= 191).

Batch	<i>Campylobacter jejuni</i>				<i>Campylobacter coli</i>			
	Ciprofloxacin		Erythromycin		Ciprofloxacin		Erythromycin	
	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant
A	21 (50.0) ^a	21 (50.0) ^a	42 (100)	/	/	/	/	/
B	2 (5.0) ^b	38 (95.0) ^a	40 (100)	/	/	/	/	/
C	/	15 (100.0)	15 (100)	/	/	/	/	/
D	1 (4.0) ^b	24 (96.0) ^a	25 (100)	/	/	1 (100)	1 (100)	/
E	2 (5.0) ^b	37 (95.0) ^a	39 (100)	/	/	1 (100)	1 (100)	/
F	2 (8.0) ^b	23 (92.0) ^a	24 (96.0) ^a	1 (4.0) ^b	/	3 (100)	3 (100)	/
Total	28 (15.0)^b	158 (85.0)^a	185 (99.5)^a	1 (0.5)^b	/	5 (100)	5 (100)	/

^{a,b} Rows with different superscripts letters are significantly different ($p < 0.05$)

- Borck, B., Sommer, H.M., Larsen, L.S., Sørensen, A.I.V., David, B., Hofshagen, M. and Rosenquist, H. 2016. Farm specific risk factors for *Campylobacter* colonisation in Danish and Norwegian broilers. *Prev Vet Med.* 130: 137–145.
- Chen, X, Naren G-W, Wu C-M, Wang Y, Dai L, Xia L-N., Luo, P., Zhang, Q., and Shen, J. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol.* 144: 133–139.
- CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Ninth Edition. 2012. Approved Standard M07-A9. CLSI.
- Colles, F.M, McCarthy, N.D., Layton, R. and Maiden, M. 2011. The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. *PLoS One.* 6: e22825.
- Giacomelli, M., Andrighetto, C., Rossi, F., Lombardi, A., Rizzotti, L., Martini, M. and Piccirillo, A. 2012. Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. *Avian Pathol.* 41: 579–588.
- Hue, O., Allain, V., Laisney, M-J., Le Bouquin, S., Lalonde, F., Petetin, I., Rouxel, S., Quesne, S., Gloaguen, P., Picherot, M., Santolini, J., Bougeard, S., Salvat, G. and Chemaly, M. 2011. *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microb.* 28: 862–868.
- Gouvêa, R., Santos, F.F. dos, Aquino, M.H.C., and Pereira, V.L de A. 2015. Fluoroquinolones in industrial poultry production bacterial resistance and food residues: a review. *Braz J Poultry Sci.* 17 (1): 1–10.
- Hungaro, H.M., Mendonça, R.C.S., Rosa, V.O., Badaró, A.C.L., Moreira, M.A.S. and Chaves, J.B.P. 2015. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control.* 51: 15–22.
- Ingesa-Capaccioni, S., González-Bodí, S., Jiménez-Trigos, E., Marco-Jiménez, F., Catalá Vega, S. and Marin, C. 2015. Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp. *J Poultry Sci.* 94: 766–771.
- Jamali, H., Ghaderpour, A., Radmehr, B., Chuan Wei, K.S., Chai, L.C. and Ismail, S. 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolates in ducks and geese. *Food Control.* 50: 328–330.
- Lee, M.D., and Newell, D.G. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis.* 50, 1–9.
- Mäesaar, M., Kramarenko, T., Meremäe, K., Sögel, J., Lillenberg, M., Häkkinen, L., Ivanona, M., Kovalenko, K., Hörman, A., Hänninen, M.L. and Roasto, M. 2016. Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chicken Meat of Estonian, Latvian and Lithuanian Origin at Estonian Retail Level and from Patients with Severe Enteric Infections in Estonia. *Zoonoses Public Health.* 63: 89–96.
- McDermott, P., Bodies, S., English, L., White, D., Walker, R., Zhao, S., Simjee, S., and Wagner, D. 2002. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. *J INFECT DIS.* 185: 837-840.
- Orrego, M., Weiler, N., Portillo, R., Lird, G., Acosta, L., Ortiz, F., Mereles, E., Rodríguez, G., Menacho, C., Fernandez, P., Melgarejo, N., Zarate, N., Huber, C., and Alvarez, M. Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012, Paraguay. Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012, Paraguay. *Pediatr.* 41 (2): 127–130.
- Payot, S., Bolla, J-M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F. and Zhang, Q. 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 8: 1967–1971.
- Prachantasena, S., Charunontakorn, P., Muangnoicharoen, S., Hankla, L., Techawal, N., Chaveerach, P., Tuitemwong, P., Chokesajjawatee, N., Williams, N., Humphrey, T., and Luangtongkum, T. 2016. Distribution and Genetic Profiles of *Campylobacter* in Commercial Broiler Production from Breeder to Slaughter in Thailand. *PLoS One.* 11: e0149585.
- Quetz JS, Lima IFN, Havt A, Prata MMG, Cavalcante PA, Medeiros PHQS, et al. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *J Med Microbiol* 2012; 61: 507–513.
- Rojas, D., Simón, C., Feltes, P., Acosta, F., González, E. and Alárcon, G. Informe sobre la georeferenciamiento de granjas avícolas de tipo comercial. SENACSA, San Lorenzo, 2010, 30 pp.
- Robyn, J., Rasschaert, G., Pasmans, F. and Heyndrickx, M. 2015. Thermotolerant *Campylobacter* during Broiler Rearing: Risk Factors and Intervention: *Campylobacter* during broiler rearing: Risk factors and intervention. *Compr Rev in Food Sci and Food Saf.* 14: 81–105.
- R Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., Maturana, M., Delgado, L., Contrera, A., Chavez, D. and Quevedo, I. 2002. Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Rev Chilena Infectol.* 28: 555–562.
- Saleha, A.A. 2002. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* from broiler chickens in Malaysia. *Int J Poultry Sci.* 1: 94–97.
- Sahin, O., Morishita, T.Y., and Zhang, Q. 2002. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim. Health Res. Rev.* 3, 95–105.
- Saiyudthong, S., Phusri, K. and Buates, S. 2015. Rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in fresh chicken meat and by-products in Bangkok, Thailand, Using Modified Multiplex PCR. *J Food Prot.* 78: 1363–1369.
- Seliworstow, T., De Zutter, L., Houf, K., Botteldoorn, N., Baré, J. and Van Damme, I. 2016. Comparative performance of isolation methods using Preston broth, Bolton broth and their modifications for the detection of *Campylobacter* spp. from naturally contaminated fresh and frozen raw poultry meat. *Int J Food Microbiol.* 234: 60–64.
- Silva, D.T., Tejada, T.S., Blum-Menezes, D., Dias, P.A. and Timm, C.D. 2016. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. *Int J of Food Microbiol.* 217: 189–194.

- Tamborini, A.L., Casabona, L.M., Viñas, M.R., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M.I., Lucero, M., Corso, A. and Pichel, M. 2012. *Campylobacter* spp.: prevalencia y caracterización fenotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Argent Microb.* 44: 266:271.
- Thakur, S., Zhao, S., Mc Dermott, P.F., Harbottle, H., Abbott, J., English, L., Gebreyes, W. and White, D. 2010. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. *Foodborne Pathog and Dis.* 7: 835–844.
- Vandamme, P., Van Doorn, L.J., Al Rashid, S.T., Quint, W.G., van der Plas, J., Chan, V. and On, S. 1997. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Wron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1055-1060
- USAID. 2010. United States Agency International Development. Producción Avícola: Negocio en Crecimiento. USAID, Asunción, Paraguay. https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/produccion_avicola.pdf
- Wang, Y., Dong, Y., Deng, F., Liu, D., Yao, H., Zhang, Q., Shen, J., Zhihai, L., Yanan, G., Congming, W. and Zhangqi, S. 2016. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008–14. *J Antimicrob Chemother.* 71: 666–669.
- Wieczorek, K., Denis, E. and Osek, J. 2015. Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *Int J Food Microbiol.* 210: 24–32.
- Wieczorek, K.; Bocian, Ł.; Osek, J. 2020. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from carcasses of chickens slaughtered in Poland – a retrospective study. *Food Control.* 112.
- WHO. 2007. Who Global Salm Surv. Manual de Procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Campylobacter* spp. http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf
- Yew Huat, J.T., Abdul Aziz, S., Abu, J., Mohamad, Gh. F., Tuan Chile, T.Z., Ahmad, N., Afriani, S., Mitsuaki, N., Son, R. 2010. Thermophilic *Campylobacter* spp. Occurrence on Chickens at Farm, Slaughter House and Retail. *Int J Poultry Sci.* 9: 134–138.
- Zhao, S., Young, S.R., Tong, E., Abbott, J.W., Womack, N. and Friedman, S.L. and Mc Dermott, P. 2010. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolates from Retail Meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl and Environ Microbiol.* 76: 7949–7956.
- Zendehbad, B., Khayatzadeh, J. and Alipour, A. 2015. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates of retail broiler meat in Iran. *Food Control.* 53: 41–45.



Asociación entre la composición corporal, fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico en los jugadores del rugby sevens universitario

Association between body composition, explosive force and some physical performance parameters in university rugby sevens players

Jhonny David Madroñero Navarro¹✉ , Juan Camilo Castellar García¹✉ , Sebastián Gutiérrez Muñoz¹✉ , Diego Camilo García-Chaves¹*✉ , Luisa Fernanda Corredor-Serrano¹✉

¹ Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, Colombia.

RESUMEN

La composición corporal ha sido asociada al desempeño físico en los deportes de cooperación y oposición como el rugby sevens, el cual se expresa por medio de las capacidades físicas. Objetivo: Determinar la asociación entre la composición corporal, fuerza explosiva (FE) y algunos parámetros de desempeño físico en jugadores de Rugby sevens universitario (edad $22,8 \pm 3,4$ años, peso de $85,2 \pm 12,6$ kg, talla $176,7 \pm 4,8$ cm, masa muscular $41,6 \pm 5,4$ Kg, porcentaje de grasa $17,0 \pm 4,4$ %). Método: Se evaluó la composición corporal por medio del método antropométrico, FE a través de la altura y la potencia del salto squat jump (SJ) y el salto en contramovimiento (CMJ), agilidad con Test de Illinois y velocidad en 30 m lanzados. Resultados: Se hallaron asociaciones entre la masa muscular con la potencia del SJ ($r = 0,76$; $p < 0,01$) y con la potencia del CMJ ($r = 0,73$; $p < 0,03$), de igual forma entre el porcentaje de grasa y la resistencia ($r = 0,90$; $p < 0,00$). Conclusión: hay asociación entre la masa muscular y la FE, como también del porcentaje de grasa con la agilidad y resistencia en los jugadores de Rugby sevens de nivel universitario.

Palabras clave: Desempeño físico; Fuerza; Resistencia; Agilidad.

ABSTRACT

Body composition has been associated with physical performance in cooperation and opposition sports such as rugby sevens, which is expressed through physical abilities. Objective: Determine the association between body composition, explosive strength (FE) and some parameters of physical performance in university Rugby sevens players (age $22,8 \pm 3,4$, weight $85,2 \pm 12,6$ kg, height $176,7 \pm 4,8$ cm, muscle mass $41,6 \pm 5,4$ kg, fat percentage $17,0 \pm 4,4$ %). Methods: Body composition was evaluated by means of the anthropometric method (FE), through the height and power of the squat jump (SJ), the countermovement jump (CMJ), agility with the Illinois Test and speed in 30 m thrown. Results: Associations were found between muscle mass with SJ power ($r = 0,76$; $p < 0,01$) and with CMJ power ($r = 0,73$; $p < 0,03$), in the same way between the percentage of fat and endurance ($r = 0,76$;

$p < 0,01$). Conclusion: There is an association between muscle mass and FE, as well as the percentage of fat with agility and resistance in Rugby sevens players at university level.

Keyword: Physical performance; Force; Endurance; Agility.

INTRODUCCIÓN

El rugby sevens es un deporte de conjunto, el cual es muy popular en competiciones tales como los Juegos Olímpicos, Copa del Mundo de Rugby 7, la Serie Mundial de Rugby 7, sin embargo, también se presenta a nivel universitario en muchos países. Este deporte se juega con un reglamento similar y una cancha de las mismas dimensiones que el Rugby Unión, practicado en un campo abierto de 100 m de largo x 70 m de ancho, con verticales formando una "hache" (H). Se disputa entre dos equipos, en dos tiempos de 7 min cada uno, por lo tanto, la cantidad de jugadores por equipo y el tiempo de juego modifican considerablemente las condiciones (Ross *et al.*, 2015), de ahí que el adecuado desarrollo de las capacidades físicas es un requisito en la búsqueda del óptimo desempeño deportivo en el rugby en todos los niveles.

En cuanto a la composición corporal y el desempeño físico en los deportes de cooperación y oposición tales como el rugby, estudios previos han relacionado variables antropométricas como el peso, talla, masa muscular y porcentaje de grasa con la fuerza, velocidad, resistencia y agilidad (Corredor-Serrano *et al.*, 2022; Fernández-Corte *et al.*, 2021; García-Chaves *et al.*, 2021; 2023), por lo tanto, la medición de variables antropométricas en deportistas ofrece información adicional sobre sus características corporales, su estado de forma y los efectos que tiene el entrenamiento sobre estos (Salas-Morillas *et al.*, 2022), concluyendo que la optimización de la composición corporal es un factor importante para poder aumentar el rendimiento deportivo (Marín *et al.*, 2020), lo que puede definir su capacidad para hacer frente a las exigencias de su deporte (Agar-Newman *et al.*, 2017).

De igual manera, se debe afirmar que el rugby sevens es un deporte que demanda el desarrollo de capacidades físicas como la fuerza explosiva (FE), la resistencia, la aceleración y la agilidad, las cuales pueden ser reflejadas en las acciones propias del juego (Martins *et al.*, 2018) como controlar la po-

*Autor para correspondencia: Diego Camilo García Chaves
 correo-e: diego.garcia@endeporte.edu.co

Recibido: 18 de junio de 2022

Aceptado: 14 de septiembre de 2023

Publicado: 24 de octubre de 2023

sesión del balón (Duthie *et al.*, 2003), al igual que con la capacidad de recuperación entre la ejecución de esfuerzos de alta intensidad con corta duración y larga duración. Adicionalmente como lo indica Rodríguez-Baena & Gálvez-González (2021) la velocidad y la aceleración son requisitos esenciales en este deporte, ya que a menudo se requiere que los jugadores aceleren para tomar una posición cercana o correr una distancia extensa, siendo una capacidad de fácil observación en acciones de ataque o defensa donde se requieren breves aceleraciones, cambios de dirección y carreras de velocidad de variada duración.

La FE es el resultado de la relación entre fuerza aplicada y el tiempo necesario para realizar una acción (Jiménez-Reyes *et al.*, 2011) y como lo afirma Argus *et al.* (2012), altos niveles de fuerza y potencia son determinantes en el desempeño en deportes con frecuente contacto como el rugby sevens, donde se presentan colisiones entre deportistas por medio de las acciones específicas, lo cual demanda fuerza en acciones como el ruck, tackle, scrumstack o por medio de impactos portando el balón. Por lo tanto, la FE es fundamental para el desempeño competitivo, especialmente en acciones deportivas donde la potencia y la velocidad del movimiento están presentes (Naclerio *et al.*, 2004).

Por otra parte, a medida que el deporte universitario va adquiriendo un mayor nivel competitivo en los países que integran suramérica, se convierte en una necesidad realizar evaluaciones e investigaciones regulares que aporten información de diferentes componentes del proceso de entrenamiento, como las características antropométricas y la condición física, en la búsqueda de logros deportivos, siendo la base para el desarrollo deportivo de cada modalidad con miras a diferentes niveles y categorías.

Al poder establecer y analizar la relación que puede darse entre la composición corporal, la fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico, se obtiene información que permite comprender cómo se comportan dichas variables con relación a las demás y la manera en la que el desempeño de los deportistas durante el juego se ve influenciado por estas. De esta forma, el objetivo de esta investigación fue determinar la asociación entre la composición corporal, la fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico en los jugadores de Rugby sevens de nivel universitario.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño de esta investigación se realizó con un enfoque cuantitativo, de alcance correlacional y una dimensión transversal.

Participantes

Fueron evaluados 16 jugadores de rugby sevens de nivel universitario rama masculina (edad $22,8 \pm 3,4$ años, peso de $85,2 \pm 12,6$ kg, talla $176,7 \pm 4,8$ cm), seleccionados a través de un muestreo no probabilístico por conveniencia, los cuales hacen parte del equipo de rugby sevens de la Institución

Universitaria Escuela Nacional del Deporte, Colombia. Los participantes no debían presentar lesiones en miembros inferiores en los últimos seis meses a la realización de las pruebas y estar activos en el proceso de entrenamiento. Todos previamente fueron informados del objetivo, procedimientos, riesgos y beneficios de la investigación y aprobaron voluntariamente su inclusión firmando un consentimiento informado. El estudio en sus procedimientos garantizó la protección de los sujetos según lo dispuesto en la Declaración de Helsinki actualizada en 2013 en Fortaleza Brasil y lo dispuesto en la normatividad colombiana (Resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social sobre investigación en salud y la Ley 1581 de 2012, sobre protección de datos personales), todo lo anterior fue aprobado por el Comité de ética de la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, Cali-Colombia bajo el acta 017 del 22 de marzo de 2022.

Procedimiento

Los participantes fueron sometidos a la evaluación de la composición corporal y a las pruebas de desempeño físico para la fuerza explosiva, agilidad, resistencia y velocidad. Dichas pruebas se tomaron previo al entrenamiento habitual, sin haber realizado ningún tipo de actividad física que pudiera generar fatiga y sudoración en los deportistas. Se determinó la composición corporal siguiendo todos los protocolos de la International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK) por medio de un evaluador certificado nivel II, teniendo en cuenta que un medidor acreditado ISAK de nivel II cuenta con un error técnico de medición (ETM) intraobservador de 5,0 % para pliegues y el 1,0 % para parámetros y diámetros (Stewart *et al.*, 2011). Se registraron las siguientes medidas: Talla, peso, ocho pliegues cutáneos (tricipital, subescapular, bicipital, cresta ilíaca, supraespinal, abdominal, muslo, pierna), siete perímetros corporales (brazo relajado, brazo contraído, cintura, cadera, antebrazo, muslo medio y pierna) y tres diámetros óseos (húmero, fémur y biestiloideo).

La composición corporal se estableció por medio del cálculo de la masa muscular utilizando la fórmula de Lee *et al.* (2000), la masa ósea con la fórmula de Rocha (1975) y el porcentaje de grasa con fórmula de Faulkner. (1958), atendiendo las orientaciones del Consenso del Grupo Español de Cineantropometría (GREC) de la Federación Española de Medicina del Deporte (Alvero *et al.*, 2009).

Para la determinación de la fuerza explosiva se utilizó el sensor fotoeléctrico "Wheeler Jump" de marca Wheeler Tecnología (Colombia), el cual es un sistema inalámbrico, portátil y ligero que permite evaluar el salto vertical estimando la altura durante el tiempo de vuelo (Patiño-Palma *et al.*, 2022). En el cual se ejecutaron 2 saltos, uno de ellos el SJ para determinar la altura y potencia del salto vertical, durante la ejecución se indicó a los participantes que apoyaran las manos en las caderas, los pies separados de manera que pudieran adoptar una posición de rodillas flexionadas (aproximadamente 90°) durante 5 s y luego hicieran un salto vertical de esfuerzo máximo. También se ejecutó el salto CMJ,

registrando la altura y potencia alcanzada del salto vertical, se indicó al participante que apoyaran las manos en las caderas, los pies separados al ancho de los hombros, los participantes iniciaban en posición erguida y realizaban un movimiento hacia abajo y seguido un salto vertical de esfuerzo máximo. Se completaron 3 intentos de cada salto con un minuto de recuperación entre intentos (Moran *et al.*, 2017), registrando el de mejor desempeño.

En el caso de la evaluación de la agilidad, se utilizó el test de Illinois, el cual se realizó en un terreno plano y rectangular de diez por cinco (10x5) m, con un cono en cada extremo, dicho rectángulo se dividió en dos mitades iguales de forma vertical, mediante una recta de cuatro conos con tres comas tres (3,3) m de separación entre los mismos (Figura 1). El deportista debía ubicarse en posición de plancha boca abajo, con sus dos manos a la altura de los hombros en el punto de partida cono "A", a la señal de salida, debía colocarse de pie e iniciar su desplazamiento a máxima velocidad hacia el cono "B" y rodearlo para dirigirse a la parte inferior de la recta de 4 conos rodeándolos de ida y vuelta, luego dirigirse al cono "C" y rodearlo, para finalizar desplazándose en línea recta al cono "D", por lo cual se exige su ejecución en el menor tiempo posible, para dar cuenta de sus niveles de agilidad, registrándose el promedio de tiempo de dos intentos (García-Chaves *et al.*, 2021). Seguido a esto se llevó a cabo el test de 30 m con salida lanzada para la evaluación de la velocidad, se utilizó un terreno plano y recto de 50 m. Los cronometristas se ubicaron a 10 y 40 m de la línea de salida. Inicialmente, el participante se colocó en posición de salida alta, detrás de una línea situada a 10 m del registro inicial. A la señal, el ejecutante comenzó a correr lo más rápido posible con el objetivo de alcanzar la máxima velocidad al comenzar los 30 m. Se registró el tiempo promedio de dos intentos realizados para disminuir el error de medición humano (Martínez, 2015).

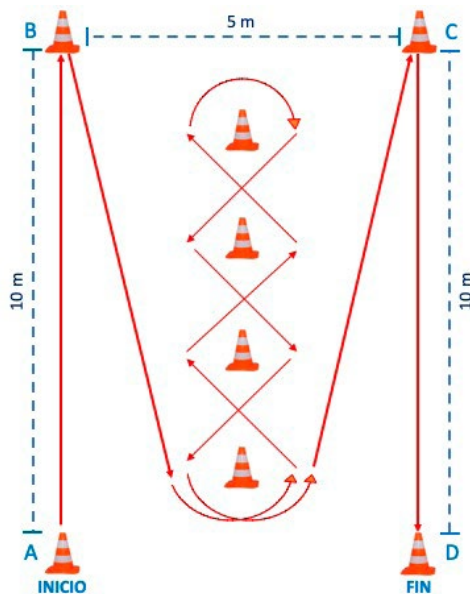


Figura 1. Test de Illinois.
Figure 1. Illinois test.

Finalmente, para evaluar la capacidad de realizar esfuerzos repetidos de alta intensidad, se utilizó el bronco test, realizando la evaluación en una cancha de Rugby de césped natural, en el cual los jugadores realizaron cinco aceleraciones a máxima intensidad a tres marcas ubicadas en distintas distancias. La primera marca se encontraba a 20 m y el jugador debía ir y volver. La segunda marca estaba a los 40 m y el jugador también debe ir y volver hasta el punto cero, por último debían dirigirse a la marca en 60 m y volver hasta la posición de salida. Esto se debía repetir cinco veces en el menor tiempo posible, realizando un solo intento, registrándose el tiempo utilizado para el recorrido en minutos y segundos (Zúñiga-Vergara *et al.*, 2023).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento y análisis de datos se realizó en el software SPSS (IBM Corporation, USA) versión 26.0 para Mac. Se comprobó el supuesto de normalidad de los datos con la prueba Shapiro-Wilk y la asociación entre las variables se estableció por medio del coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación fue determinar la asociación entre la composición corporal, la fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico en jugadores de Rugby sevens de nivel universitario, por lo cual es importante mencionar que dicha asociación entre variables ha sido estudiada previamente en deportes de conjunto en diferentes niveles de competencia tales como en el baloncesto (Corredor-Serrano *et al.*, 2022), voleibol (Rodríguez *et al.*, 2020), fútbol (Benítez *et al.*, 2015), rugby unión (Jones *et al.*, 2019), rugby sevens (García-Chaves *et al.*, 2023), fútbol sala (Torrijos *et al.*, 2019). Los cuales suelen presentar continuos cambios de la velocidad y dirección, demandando un alto desempeño respecto a la fuerza, velocidad, resistencia y agilidad (García-Chaves *et al.*, 2021).

Primeramente, se exponen los datos descriptivos de la composición corporal de la población. En la Tabla 1 se presenta la caracterización de la composición corporal de los jugadores de rugby universitario, resaltando que en dichas variables se presenta normalidad estadística.

En relación con la composición corporal de los jugadores de rugby, se debe resaltar que los estudios desarrollados son realizados mayoritariamente en la modalidad del rugby unión, lo que demanda la necesidad de aumentar los estudios en el rugby sevens a nivel internacional, sin embargo, algunos autores (García-Chaves *et al.*, 2023; Loturco *et al.*, 2017; Ross *et al.*, 2015) afirman que las características antropométricas y de composición corporal de los jugadores de rugby sevens son semejantes a los jugadores de la línea (backs) del rugby unión, debido a las demandas físicas y energéticas propias del juego.

En cuanto a las variables relacionadas con la composición corporal como la talla y el peso, Azevedo *et al.* (2018), encontraron valores superiores de talla y peso en jugadores

Tabla 1 . Descripción de la composición corporal (n = 16).
Table 1. Description of body composition (n = 16).

	Media (D.E)	IC 95 %		Prueba de normalidad (Sig.)
		Límite inferior	Límite superior	
Peso (kg)	85,18 (12,61)	75,48	94,87	0,770
Talla (cm)	176,67 (4,77)	173,00	180,33	0,913
Masa muscular (kg)	41,63 (5,40)	37,48	45,77	0,945
Masa ósea (kg)	12,41 (0,97)	11,67	13,16	0,958
Grasa corporal (%)	17,02 (4,43)	13,62	20,43	0,966
Sumatoria 4 pliegues (mm)	73,44 (28,95)	51,18	95,69	0,862
Sumatoria 6 pliegues (mm)	101,77 (40,88)	70,35	133,20	0,951
Sumatoria 8 pliegues (mm)	135,22 (55,24)	92,75	177,69	0,924

D.E: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza para la media; Prueba de normalidad: Shapiro-Wilk, p > 0,05.

universitarios brasileños de rugby sevens, al igual que lo hallado por Gayol & Sillero. (2019) con jugadores de la línea (backs) de rugby unión de la división de honor y de la división B de España, como también en el estudio de Solís *et al.* (2021) con los jugadores de las selecciones U18 y U20 de rugby quince de España, sin embargo, se debe tener en cuenta que uno de los factores que podría influir en esto puede ser la diferencia en la modalidad. Por otro lado, estudios realizados por Rodríguez *et al.* (2008) y Suárez-Moreno & Núñez (2011) ejecutados con jugadores élite de rugby en Chile y en España, respectivamente, se hallaron valores similares de talla, respecto al peso, los resultados fueron mayores en ambos estudios al compararse con los resultados de esta investigación. En investigaciones realizadas en Chile (Báez-San Martín *et al.*, 2019), en España (Hernández & Rodríguez, 2020) y en Zimbabue (Van Den Berg *et al.*, 2021) los valores de la talla y peso de la población fueron similares, comparándose con la presente investigación. En Chile el estudio fue llevado a cabo con jugadores de clubes deportivos y equipos universitarios, mientras que en España fue realizado con jugadores amateurs, tan solo en el caso de Zimbabue el estudio se llevó a cabo con deportistas de alto rendimiento deportivo.

Con respecto a la masa muscular, en el estudio realizado por Van Den Berg *et al.* (2021) se presentaron valores semejantes a los de este estudio, debido a la similitud en la modalidad y el nivel competitivo, por otro lado, Hernández & Rodríguez. (2020) hallaron valores inferiores dado que se realizó en la modalidad de rugby 15, pero con población amateur, al igual que lo reportado por Solís *et al.* (2021) quienes hallaron valores inferiores de masa muscular debido posiblemente a que su población era inferior en edad con respecto a este estudio.

En el caso del estudio de Gayol & Sillero. (2019) llevado a cabo en la modalidad de rugby unión se encontraron valores superiores de masa muscular y valores inferiores de porcentaje de grasa, quizás debido a que este estudio se realizó con deportistas de élite de dos categorías, la división de honor y la división de honor B de España, este comporta-

miento correspondería a la diferencia del nivel deportivo de la población. En el caso de Suárez-Moreno & Núñez. (2011) los porcentajes de grasa hallados fueron también inferiores a los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que los sujetos de este estudio compiten en la máxima categoría española, y también hacen parte de selecciones nacionales.

También es de gran importancia mencionar que, si bien hay más investigaciones y hallazgos al respecto de la composición corporal, la mayoría de investigaciones difieren las formas de calcular dichas variables, dado la gran cantidad de fórmulas, las cuales difieren de los utilizados en este estudio, de tal manera no es posible hacer una comparación directa para las variables mencionadas con toda la literatura actual, sin embargo, a través de una revisión sistemática (Ross *et al.*, 2013), se afirma que el cálculo del porcentaje de grasa para deportistas de Rugby Sevens en varios estudios se hizo a través de la sumatoria de pliegues y sus respectivas fórmulas asociadas.

En la Tabla 2, se presentan los datos obtenidos en relación con la FE por medio de los valores de desempeño en el SJ y CMJ expresados en altura y potencia, al igual que los resultados de agilidad, velocidad y resistencia expresados en tiempo. En todos los casos, dichas variables presentaron normalidad estadística.

Respecto a la FE, en los estudios relacionados se encuentra que el componente excéntrico medido a través del CMJ es superior que el componente concéntrico medido a través del SJ, por lo cual los estudios refieren que la capacidad excéntrica supera a la concéntrica entre 5 y 10 % a nivel profesional y universitario, concordando con lo hallado en el presente estudio, donde el CMJ es 12 % superior al SJ, lo que corresponde directamente a las características del rugby sevens, donde se presentan acciones de alta intensidad, con frecuentes cambios de ritmo, tales como aceleraciones y desaceleraciones con variados cambios de dirección por frecuentes acciones de contacto o evasión (Jones *et al.*, 2017).

En cuanto a los valores calculados de fuerza explosiva, Fernández *et al.* (2020) encontró en deportistas profesionales de la selección de rugby sevens de Chile, valores de potencia

Tabla 2. Características de FE y desempeño físico (n = 16).
Table 2. Characteristics of FE and physical performance (n = 16).

	Media (D.E)	IC 95 %		Prueba de normalidad (Sig.)
		Límite inferior	Límite superior	
Altura SJ (cm)	32,57 (5,74)	28,16	36,98	0,802
Potencia SJ (watts)	2746,56 (459,38)	2393,45	3099,67	0,960
Altura CMJ (cm)	37,15 (7,60)	31,31	42,99	0,848
Potencia CMJ (watts)	3144,97 (649,82)	2645,47	3644,47	0,958
Illinois (seg)	18,03 (0,69)	17,50	18,56	0,949
30 m (seg)	3,91 (0,29)	3,69	4,13	0,890
Bronco (min)	5,65 (0,76)	5,07	6,23	0,929

D.E: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza para la media; Prueba de normalidad: Shapiro-Wilk, p > 0,05.

superiores a los encontrados en esta investigación al realizar el test de CMJ, comportamiento que es similar a lo encontrado por Loturco *et al.* (2017) el cual evidencia datos de CMJ y SJ en jugadores de rugby profesional participantes del ciclo olímpico de Río 2016, dichos valores superiores pueden darse debido a las diferencias en el nivel de entrenamiento y competencia de las poblaciones, ya que las mencionadas poblaciones de comparación son de selecciones nacionales de sus países respectivamente y no de nivel universitario como el de este estudio. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2008), en su evaluación a jugadores de rugby chilenos, obtuvieron valores de altura en el CMJ cercanos a los expuestos por la población del presente estudio, al igual que lo hallado por Azevedo *et al.* (2018) evaluando a deportistas de rugby de Lavras, Brasil, esto debido a la equivalencia presentada en variables como edad, peso, talla y nivel competitivo.

En cuanto al desempeño físico referente a la agilidad evaluada por medio del test de Illinois, Müller *et al.* (2018), al valorar la aptitud física de jugadores aficionados de clubes de la región de Rio Grande del Sur en Brasil de la modalidad de rugby unión, encontraron valores similares a la población analizada en el presente estudio, lo anterior puede deberse al semejante rango de edad entre las dos muestras utilizadas. De la misma forma, Spamer & De la Port (2006) al evaluar capacidades física y antropométricamente a deportistas elite de rugby seven U16 y U18 de Sudáfrica, obtuvieron datos superiores en dicha prueba a comparación de los obtenidos en este estudio, lo anterior podría haberse dado por factores tales como la edad, la preparación deportiva, factores socio-demográficos, y diferencias antropométricas presentadas por los estudios en cuestión.

Con relación a la resistencia evaluada por medio del test de bronco, Baki *et al.* (2022) al evaluar jugadores de la selección de rugby union de Malasia, encontraron un comportamiento similar respecto a la población de este estudio, siendo de modalidades diferentes del rugby; sin embargo, se debe resaltar que la población del presente estudio es de ni-

vel universitario y la del estudio anteriormente mencionado es el seleccionado de Malasia en esta modalidad. En contraste a lo anterior (Deuchrass *et al.*, 2019), en su estudio obtuvieron como resultado en la misma prueba mejores resultados en la misma prueba, dicha superioridad podría deberse a que la población evaluada eran deportistas de alto rendimiento de un país con amplia tradición y desarrollo del rugby, como lo es nueva zelanda. Respecto a la velocidad de aceleración evaluada mediante el test de 30 m lanzados (García-Chaves *et al.*, 2023) evaluaron jugadores de rugby sevens elite mayores en colombia reportaron un comportamiento similar a las del presente estudio, quizás por la similitud en los rangos de edad, así como por el desarrollo homogéneo de dicha modalidad y su masificación en los últimos años en este país.

La Tabla 3 presenta las correlaciones que se presentaron entre las variables de estudio de composición corporal y FE, donde se puede evidenciar y se resalta una relación significativa alta entre el porcentaje de masa muscular y la potencia alcanzada en el SJ y el CMJ. La alta relación entre la masa muscular y la potencia obtenida en ambos saltos indica que a mayores valores de masa muscular se presenta mayor potencia en el SJ y en el CMJ en esta población, lo cual se encuentra en concordancia con lo evidenciado en los estudios de Jones *et al.* (2019) y Martins *et al.* (2018) en poblaciones similares. Es de resaltar que dichas relaciones también han sido expresadas en otros tipos de deporte como el atletismo (Balsalobre *et al.*, 2012), baloncesto (García-Chaves *et al.*, 2021) y taekwondo (Ojeda-Aravena *et al.*, 2021).

En la Tabla 4 se presenta la relación entre las variables de composición corporal y el desempeño físico, donde se pudo evidenciar una alta relación entre el peso y el test de Bronco, lo que puede indicar que, a mayor peso, mayor tiempo de ejecución el test de Bronco, expresándose como menor resistencia. De igual forma, se encontró una muy alta relación entre el porcentaje de grasa y el tiempo de ejecución en el test de Bronco, como también entre el porcentaje de grasa y el tiempo de ejecución en el test de 30 m lanzados. Esto

Tabla 3. Relación entre la composición corporal y FE.

Table 3. Relationship between body composition and FE.

	SJ ALTURA	SJ POTENCIA	CMJ ALTURA	CMJ POTENCIA
PESO	-0,392 (p=0,297)	0,526 (p=0,145)	-0,207 (p=0,593)	0,541 (p=0,132)
MASA MUSCULAR	0,159 (p=0,683)	0,764* (p= 0,016)	0,260 (p=0,498)	0,726* (p=0,027)
MASA OSEA	-0,404 (p=0,281)	0,079 (p=0,840)	-0,300 (p=0,433)	0,123 (p=0,752)
% DE GRASA	-0,610 (p=0,081)	0,049 (p=0,900)	-0,475 (p=0,196)	0,082 (p=0,834)

*Correlación significativa p < 0,05; ** Correlación significativa p < 0,001.

Tabla 4. Relación entre la composición corporal y desempeño físico.

Table 4. Relationship between body composition and physical performance.

	BRONCO	ILLINOIS	30 m
PESO	0,722* (p=0,028)	0,311 (p=0,415)	0,618 (p=0,076)
MASA MUSCULAR	0,340 (p=0,370)	0,050 (p=0,897)	0,047 (p=0,903)
MASA OSEA	-0,011 (p=0,978)	-0,334 (p=0,380)	0,282 (p=0,462)
% DE GRASA	0,902** (p=0,001)	0,192 (p=0,621)	0,805** (p=0,009)

*Correlación significativa p < 0,05; ** Correlación significativa p < 0,001.

indica que mayores valores de grasa corporal son negativos para el desempeño en ambos test anteriormente mencionar, dado que a mayor porcentaje de grasa, mayor será el tiempo que se tarde en ejecutar ambos test, expresándose en menor desempeño referente a la resistencia y velocidad (Tirado *et al.*, 2023).

Se observa en la Tabla 5 la relación de los resultados obtenidos en los test de desempeño físico entre sí mismos y con la altura alcanzada en el SJ y el CMJ. Se destaca entre los hallazgos una alta relación entre el test de Bronco y el

test de 30 m lanzados, dicha relación podría evidenciar que el desempeño en uno de los test se verá reflejada en el otro. También se halló una alta relación negativa entre la altura del SJ y el desempeño en el test de 30 m lanzados, lo que indica que el aumento en el resultado obtenido en una de ellas implicará una disminución en el resultado de la otra variable, esto permitiría inferir que una mayor altura del SJ se vería reflejada en un menor tiempo de ejecución en el test de 30 m lanzados, lo que implica una mayor velocidad para estos jugadores de rugby sevens universitario.

Tabla 5. Relación interna entre desempeño físico y FE.
Table 5. Internal relationship between physical performance and FE.

	BRONCO	ILLINOIS	30 m	ALTURA SJ	ALTURA CMJ
BRONCO	---	0,365 (p=0,335)	0,785* (p=0,012)	-0,421 (p=0,260)	-0,280 (p=0,466)
ILLINOIS	0,365 (p=0,335)	---	0,236 (p=0,541)	0,329 (p=0,388)	0,453 (p=0,221)
30 m	0,785* (p=0,012)	0,236 (p=0,541)	---	-0,707* (p=0,033)	-0,555 (p=0,121)
ALTURA SJ	-0,421 (p=0,260)	0,329 (p=0,388)	-0,707* (p=0,033)	---	0,973** (p=0,000)
ALTURA CMJ	-0,280 (p=0,466)	0,453 (p=0,221)	-0,555 (p=0,121)	0,973** (p=0,000)	---

*Correlación significativa $p < 0,05$; ** Correlación significativa $p < 0,001$.

CONCLUSIONES

Se concluye que hay asociación significativa entre la masa muscular y la FE, como también del porcentaje de grasa con la agilidad y resistencia, lo que implica la afectación que tiene el desarrollo de la composición corporal sobre el desempeño físico de los jugadores de rugby del nivel universitario, sin embargo, es necesario aumentar el número de estudios sobre la asociación de dichas variables a este nivel competitivo, estandarizando las formas de medición y permitiendo aumentar el tamaño de la muestra objeto de estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Manifestamos que el documento en mención es original de nuestra autoría, aceptamos que hemos contribuido a su producción y no contiene material protegido por derechos de reproducción, ni genera conflicto de intereses, por lo cual nos hacemos responsables de su contenido.

REFERENCIAS

Agar-Newman, D.J., Goodale, T.L., Klimstra, M.D., 2017. Anthropometric and Physical Qualities of International Level Female Rugby Sevens Athletes Based on Playing Position. *J Strength Cond Res* 31, 1346–1352. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001167>

Alvero, J.R., Cabañas, M.D., Herreno, A., Martinez, L., Moreno, C., Porta, J., Sillero, M., Sirvent, J., 2009. Protocolo de valoración de la composición corporal para el reconocimiento médico-deportivo. Documento de consenso del grupo español de cineantropometría de la federación española de medicina

del deporte. *Archivos de medicina del deporte* XXVI, 166–179.

Argus, C.K., Gill, N.D., Keogh, J.W.L., 2012. Characterization of the differences in strength and power between different levels of competition in rugby union athletes. *J Strength Cond Res* 26, 2698–2704.

Azevedo, M.S., Nunes, E.M., Rodrigues, C.D., Hernández-Mosqueira, C.M., Fernandes, S., 2018. Características antropométricas y potencia de miembros inferiores en jugadores universitarios de rugby-7. *Revista en Ciencias del Movimiento Humano y Salud* 15, 1. <https://doi.org/10.15359/mhs.15-2.4>

Báez-San Martín, E., Jil-Beltrán, k, Ramírez-Campillo, R., Tuesta, M., Barraza-Gómez, F., Opitz-Ben-Hour, A., Yáñez-Sepúlveda, R., 2019. Composición Corporal y Somatotipo de Rugbistas Chilenos y su Relación con la Posición de Juego. *International Journal of Morphology* 37, 331–337. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000100331>

Baki, M.H., Mohamad, N.I. bin, Nadzalan, A.B.M., 2022. Monitoring Training Load on Malaysian Rugby 15s Players. *Ann Appl Sport Sci* 10. <https://doi.org/10.52547/aassjournal.1045>

Balsalobre, C., Del Campo, J., Tejero, C., Alonso, D., 2012. Relación entre potencia máxima, fuerza máxima, salto vertical y sprint de 30 metros en atletas cuatrocientistas de alto rendimiento. *Apunts Educación Física y Deportes* 63–69. [https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.\(2012/2\).108.07](https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.(2012/2).108.07)

Benítez, J., Da, M., Muñoz, E., Morente, A., Guillen, M., 2015. Capacidades físicas en jugadores de fútbol formativo de un club profesional. *Revista internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física del Deporte* 15, 289–307. <https://doi.org/10.15366/rimcafd2015.58.006>

- Corredor-Serrano, L.F., García-Chaves, D.C., Arboleda-Franco, S.A., 2022. Composición corporal y somatotipo en jugadores de baloncesto universitario colombianos por posición de juego. *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 45, 364–372. <https://doi.org/10.47197/retos.v45i0.85979>
- Deuchrass, R.W., Smith, H.K., Elliot, C.E., Lizamore, C.E., Hamlin, M.J., 2019. The 1.2 km shuttle run test: reliability and comparison with the yo-yo intermittent recovery level 1 test in young elite rugby union players. *Journal of Australian Strength & Conditioning* 27, 14–20.
- Duthie, G., Pyne, D., Hooper, S., 2003. *Applied Physiology and Game Analysis of Rugby Union*. *Sports medicine* 33, 973–991. <https://doi.org/10.2165/00007256-200333130-00003>
- Faulkner, J., 1958. *Physiology of swimming and diving*. Exercise Physiology. Baltimore- Academic Press.
- Fernández, G., Santorcuato, M., Guiloff, R., Bravo, J., Fuentes, E., Vaisman, A., 2020. Características antropométricas, fisiológicas y funcionales en jugadores profesionales de rugby seven. *Artroscopia* 27, 1–6.
- Fernández-Corte, J., Mandly, M., García-Rubio, J., Ibañez, S., 2021. Aportación de las jugadoras profesionales de baloncesto en función del puesto específico y la fase de competición. *E-Balonmano.com: Revista de Ciencias del Deporte* 17, 223–232.
- García-Chaves, D.C., Corredor-Serrano, L.F., Arboleda-Franco, S.A., 2021. Relación entre potencia muscular, rendimiento físico y competitivo en jugadores de baloncesto. *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 41, 191–198. <https://doi.org/10.47197/retos.v0i41.82748>
- García-Chaves, D.C., Corredor-Serrano, L.F., Díaz Millán, S., 2023. Relación entre la fuerza explosiva, composición corporal, somatotipo y algunos parámetros de desempeño físico en jugadores de rugby sevens. *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 47, 103–109. <https://doi.org/10.47197/retos.v47.95549>
- Gayol, M., Sillero, M., 2019. Características Antropométricas y la Ingesta Dietética de los Jugadores de la División de Honor y División de Honor B de un Club de Rugby Español. *Kronos* 18, 18.
- Hernández, J., Rodríguez, E., 2020. Anthropometric characteristics and somatotype profile in amateur rugby players. *Archivos Medicina del Deporte* 37, 84–91.
- Jiménez-Reyes, P., Cuadrado-Peñañel, V., González-Badillo, J.J., 2011. Análisis de variables medidas en salto vertical relacionadas con el rendimiento deportivo y su aplicación al entrenamiento. *Cultura, Ciencia y Deporte* 6, 113–119. <https://doi.org/10.12800/ccd.v6i17.38>
- Jones, P., Thomas, C., Dos'santos, T., McMahon, J., Graham-Smith, P., 2017. The role of eccentric strength in 180 turns in female soccer players. *Sports* 5. <https://doi.org/10.3390/sports5020042>
- Jones, T.W., Keane, K., Smith, A., Dent, J., McShane, K., Payne, T., Williams, L., Maguire, P., Marshall, S.J., Graham-Smith, P., 2019. Which anthropometric and lower body power variables are predictive of professional and amateur playing status in male rugby union players? *Int J Sports Sci Coach* 14, 82–90. <https://doi.org/10.1177/1747954118805956>
- Lee, R., Wang, Z., Heo, M., Ross, R., Janssen, I., Heymsfield, S., 2000. Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models. *Am J Clin Nutr* 72, 796–803. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.796>
- Loturco, I., Pereira, L.A., Moraes, J.E., Kitamura, K., Abad, C.C.C., Kopal, R., Nakamura, F.Y., 2017. Jump-squat and half-squat exercises: Selective influences on speed-power performance of elite rugby sevens players. *PLoS One* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170627>
- Marín, D.M., Toro Román, V., Pérez, F.J.G., Ibañez, J.C., Pay, A.S., Alcaraz, B.J.S., 2020. Análisis antropométrico y de somatotipo en jugadores de pádel en función de su nivel de juego (Anthropometric and somatotype analysis between padel players according to their level of play). *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 21, 285–290. <https://doi.org/10.47197/retos.v0i41.84155>
- Martínez, E., 2015. *Pruebas de aptitud física*, Segunda Ed. ed. Paidotribo, Barcelona, España.
- Martins, M., Nunes, E., Rodrigues, C., Hernández-Mosqueira, C., Fernandes da Silva, S., 2018. Características antropométricas y potencia de miembros inferiores en jugadores universitarios de rugby-7. *MHSALUD: Revista en Ciencias del Movimiento Humano y Salud* 15, 1. <https://doi.org/10.15359/mhs.15-2.4>
- Moran, J., Sandercock, G.R.H., Ramírez-Campillo, R., Todd, O., Collison, J., Parry, D.A., 2017. Maturation-related effect of low-dose plyometric training on performance in youth hockey players. *Pediatr Exerc Sci* 29, 194–202. <https://doi.org/10.1123/pes.2016-0151>
- Müller, C.B., Pinheiro, E.D.S., Soares, T.G., Del Vecchio, F.B., 2018. Efeitos do sexo e posição de jogo na aptidão física de competidores amadores de rugby union. *Pensar a Prática* 21. <https://doi.org/10.5216/rpp.v21i4.49841>
- Naclerio, F., Santos, J., Pantoja, D., 2004. Relación entre los parámetros de fuerza, potencia y velocidad, en jugadoras de Softball. *Kronos III*, 13–20.
- Ojeda-Aravena, A., Azocar-Gallardo, J., Hernandez-Mosqueira, C., Herrera-Valenzuela, T., 2021. Relación entre la prueba de agilidad específica en taekwondo (tsat), la fuerza explosiva y la velocidad líneal en 5-m atletas de taekwondo de ambos sexos. *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 39, 84–89. <https://doi.org/10.47197/retos.v0i39.78395>
- Patiño-Palma, B., Wheeler-Botero, C., Ramos-Parracé, C., 2022. Validación y fiabilidad del sensor Wheeler Jump para la ejecución del salto con contramovimiento. *Apunts Educación Física y Deportes* 149, 37–44. [https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.\(2022/3\).149.04](https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.(2022/3).149.04)
- Rocha, M., 1975. Peso óseo do brasileiro de ambos os sexos de 17 a 25 años. *Arquivos de Anatomia e Antropologia* 1, 445–451.
- Rodríguez, H., Pinto, G., Pedroso, B., 2020. Efeitos de diferentes modelos de treinamento de força e flexibilidade no desempenho do teste de salto horizontal e sentar-e-alcançar em jogadores de voleibol. *Physical Education and Sport Journal* 18, 1–7.
- Rodríguez, F., García, S., Barraza, F., Cabrera, C., Siviero, E., 2008. Variables antropométricas y su relación con el rendimiento físico en jugadores de rugby. *Revista efdeportes Revisa digital - Buenos aires* 13.
- Rodríguez-Baena, J., Gálvez-Gonzalez, J., 2021. Análisis de las demandas de Sprint en competición por puestos específicos en el rugby 7 femenino. *RETOS. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación* 39, 46–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.47197/retos.v0i39.74075>

- Ross, A., Gill, N., Cronin, J., 2015. The match demands of international rugby sevens. *J Sports Sci* 33, 1035–1041. <https://doi.org/10.1080/02640414.2014.979858>
- Ross, A., Gill, N., Cronin, J., 2013. Match analysis and player characteristics in rugby sevens. *Sports Medicine* 44, 357–367. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0123-0>
- Salas-Morillas, A., Gutiérrez-Sánchez, Á., Vernetta-Santana, M., 2022. Composición Corporal y Rendimiento Deportivo en Gimnastas de Acrobática. *International Journal of Morphology* 40, 220–227. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022022000100220>
- Solís, C., Ramos, J., Ramos, R., Aramberri, M., Calderon, F., 2021. Comparison of the anthropometric profiles of elite youth rugby union players. *Archivos de Medicina del Deporte* 38, 99–106. <https://doi.org/10.18176/ARCHMEDDEPORTE.00032>
- Spamer, E.J., De la Port, Y., 2006. Anthropometric, physical, motor, and game-specific profiles of elite u 16 and u 18 year-old south african schoolboy rugby players. *Kinesiology* 38, 176–184.
- Stewart, A., Marfell-Jones, M., Olds, T., De Ridder, H., 2011. International standards for anthropometric assessment. International Society for the Advancement of Kinanthropometry ISAK, Lower Hutt, New Zealand.
- Suárez-Moreno, L., Núñez, F., 2011. Características fisiológico-antropométricas del jugador de rugby élite en España y la potencia relativa como predictor del rendimiento en sprint y RSA. *Journal of Sport and Health Research* 3, 191–202.
- Tirado, A., Vega, P., Palomino, L., Niño, J., 2023. Nutritional status and aerobic capacity in high-performance adolescent soccer players. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 43, 90–96. <https://doi.org/10.12873/432>
- Torrijos, J., Acosta, P., Sanabria, Y., Agudelo, C., 2019. Correlación entre la fuerza explosiva del tren inferior y la agilidad en el fútbol sala. *VIREF Revista De Educación Física* 7, 99–108. <https://doi.org/10.31910/rdafd.v5.n1.2019.1120>
- Van Den Berg, P., De Ridder, J., Malan, D., Ellis, S., 2021. An Anthropometric Comparison of Different Player Positions in Elite Rugby Union Sevens. *International Journal of Sports and Physical Education* 7. <https://doi.org/10.20431/2454-6380.0701003>
- Zúñiga-Vergara, P.S., Rozas, G., Fuentes, E., Greene, C., 2023. Comparación entre variables del salto de contramovimiento entre posiciones de juego en jugadores universitarios varones de Rugby Amateurs. *Journal of Movement & Health* 20, 1–14. [https://doi.org/10.5027/jmh-Vol20-Issue1\(2023\)art180](https://doi.org/10.5027/jmh-Vol20-Issue1(2023)art180)

Effect of extracts of *Citrus sinensis* (Rutaceae) and *Trichilia havanensis* (Meliaceae) in mortality and repellence of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

Efecto de extractos de *Citrus sinensis* (Rutaceae) y *Trichilia havanensis* (Meliaceae) en mortalidad y repelencia de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

Mitchel Rivera-Hernández¹✉, Juan José Luna-Guevara^{2*}✉, Agustín Aragón-García¹✉, Betzabeth Cecilia Pérez-Torres¹✉, Jesús F. López-Olguin^{1,3,*}✉

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Science Institute, Program of Master Science in Sustainable Agroecosystem Management, Edificio VAL 1, Ecocampus Valsequillo, San Pedro Zacachimalpa, Puebla, 72960 México.

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Faculty of Chemical Engineering, College of Food Engineering, Edif. FIQ 7, Ciudad Universitaria, Puebla, 72570 México.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Vice Rectory for Research and Postgraduate Studies, Herbarium and Botanical Garden, Edif. JB, Ciudad Universitaria, Puebla, 72570 México.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of the plant extract from *Citrus sinensis* peel and *Trichilia havanensis* seeds, on mortality and repellency in different biological states of *Tetranychus urticae* under laboratory conditions. Solutions of the extracts at 500, 1000, and 1500 mg·L⁻¹ were applied to a known number of eggs, larvae, and female adults of *T. urticae* in foliar discs of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The data analysis of mortality percentage and the repellence (Kruskal-Wallis test and comparison of medians, $\alpha = 0.05$) showed that the *T. havanensis* extract presented the highest percentage of mortality in eggs with 45.0 % at 1500 mg·L⁻¹, and the *C. sinensis* extract presented the highest mortality in larvae with 40.0 % at 1000 mg·L⁻¹ and adults with a 50.0 % at 1500 mg·L⁻¹. The highest percentage of repellency was the *C. sinensis* extract at 1500 mg·L⁻¹, with 30.0 % in larvae and 60.0 % in adults. The results indicate that the extracts have the potential to develop effective products for managing *T. urticae*.

Keywords: Egg mortality, larvae repellency, chemical characterization, vegetal extract.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de los extractos de pericarpio de *Citrus sinensis* y semillas de *Trichilia havanensis* en la mortalidad y repelencia de diferentes estados biológicos de *Tetranychus urticae* en condiciones de laboratorio. Soluciones preparadas con los extractos en concentraciones de 500, 1000 y 1500 mg·L⁻¹ fueron aplicadas a un número conocido de huevos, larvas y hembras adultas de *T. urticae* en discos foliares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). El análisis de los datos del porcentaje mortalidad y repelencia (prueba de Kruskal Wallis ($\alpha = 0.05$)) mostraron que el extracto de *T. havanensis* ocasionó la mortalidad de huevos más alta con el 45 % a 1500 mg·L⁻¹, el extracto de *C. sinensis*

presentó el mayor porcentaje de mortalidad en larvas y adultos con el 40.0 % a 1000 mg·L⁻¹ y 50.0 % a 1500 mg·L⁻¹, respectivamente. El extracto de *C. sinensis* mostró el mayor porcentaje de repelencia con el 30.0 % en larvas y 60.0 % en adultos a 1500 mg·L⁻¹. Los resultados indican que los extractos tienen el potencial para desarrollar productos efectivos en el manejo de *T. urticae*.

Palabras clave: mortalidad en huevos, repelencia en larvas, caracterización química, extracto vegetal.

INTRODUCTION

Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae), commonly known as “red spider mite”, is a phytophagous mite considered an important pest for agriculture due to its short life cycle, high reproductive activity, great capacity to adapt to the environment and the host plant, and the parthenogenesis common in this species (Páramo *et al.*, 1986; Santamaría *et al.*, 2020). In Mexico, it is distributed throughout the country in crops of beans, blackberries, and strawberries (CABI, 2018). Wu *et al.* (2019) evaluated the resistance of *T. urticae* to acaricides like abamectin, fenpyroximate, and spiromeclofen, and showed a complex adaptation to these compounds by genes for enhanced metabolic detoxification in 100 % of the populations tested. The compounds of the acaricides used to manage the red mite have essential issues for human health and the environment (Hernández-Antonio and Hansen, 2011; Blanco-Muñoz *et al.*, 2016). Currently, it has been pointed out the use of different plants for pest control since they do not have adverse effects on health nor the environment; it has also been reported their effectiveness in different phytophagous by the secondary metabolites that constitute it like terpenes, aldehydes, and alcohols (Flores-Villegas *et al.*, 2019).

Citrus sinensis Obseck (Rutaceae) is important in Mexico due to its use in several industrial sectors. Their waste usually

*Author for correspondence: José Juan Luna Guevara

e-mail: juanjl.luna@correo.buap.mx; jesus.olguin@correo.buap.mx

Received: July 13, 2022

Accepted: September 21, 2023

Published: October 24, 2023

ends as soil and water contaminants, so their reuse to obtain their secondary metabolites for agricultural use can minimize the environmental impact generated. In addition, its compounds such as limonene, α -pinene, myrcene, and linalool, are attributed to bactericidal, fungicidal, and insecticidal properties (De Santana *et al.*, 2021).

Trichilia havanensis Jacq (Meliaceae), commonly known as ciruelillo in Puebla, Mexico, is native to the northeastern highlands of the state; it is used as a pest control method for grains in storage and religious ceremonies in various indigenous communities of the country (Arenas and Rodríguez-Hahn, 1990; López-Olguín *et al.*, 1997; Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). Finally, the extract consists mainly of limonoids such as havanensin and trichilenone, placing the plant as a potential pesticide (Chan *et al.*, 1973). For these reasons, this research aimed to obtain, characterize, and evaluate the mortality of eggs, larvae, and adults and their repellency by *C. sinensis* and *T. havanensis* extracts against *T. urticae* under laboratory conditions.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Orange (*C. sinensis*) peel was used, separated from the rest of the pulp, washed, and dried at 18 ± 5 °C. Finally, its size was reduced to 2 cm².

Fruits of *T. havanensis* were collected in 2019 in Cuetzalan, Puebla, Mexico; their fruits were dried at ambient temperature (18 ± 5 °C) for 20 d, the seed was separated from the pericarp, it was ground with a Nixtamatic NG-02 grain mill, and the product was sieved through a number 30 sieve (Mont-Inox).

Obtaining plant extracts

The orange peel extract was obtained by distillation with a Clevenger-type apparatus; the vegetal extract and the hydrolyte (subproduct from the distillation) were stored at -18 °C and 20 °C, respectively.

The extract of *T. havanensis* was obtained by ethanolic maceration (preliminary tests showed a low yield of obtaining the extract using the distillation method); 100 g of ground and a sieved seed were placed in an Erlenmeyer flask with a 1 L capacity, and 200 mL of ethanol were added at 25 °C with stirring (60 rpm), performing concentrations every 24 h for two d. Subsequently, the ethanol was separated from the sedimented plant material, and a purification process was given in the Hei-VAP Core rotary evaporator at a temperature of 80 °C for the water bath and 5 °C for the refrigerant medium at a speed of 80 rpm for 90 min. The purified plant extract was stored at -18 °C. The obtained hydrolyte from the preliminary tests was stored at 8 °C and used in subsequent bioassays.

Characterization of compounds from extracts of *C. sinensis* and *T. havanensis*

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity of each extract was determined with the DPPH technique; the absorbance was measured of a

standard sample prepared with the compound 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as blank and a solution of the DPPH radical with each plant extract. The inhibition percentage was calculated using formula 1 (Jaramillo *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance of standard sample} - \text{Absorbance of extract}}{\text{Absorbance of standard sample}} \quad (1)$$

Identification of plant extracts

The volatile components were analyzed and determined using an Agilent GC-MS system (6850N/5975, Santa Clara, CA) consisting of a GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an HP-5MS capillary column (0.25 μ m film thickness, 30 m length and 0.25 mm diameter), and a mass selective detector operating in the electron impact ionization mode (70 eV). GC-MS analysis was performed as follows: 1 mL/min carrier gas (helium) flow rate, 10:1 flux ratio, and injector temperature of 200 °C. The oven temperature was held at 40 °C for 3 min, then programmed to increase from 40 °C to 150 °C at a rate of 45 °C/min and 200 °C for 2 min. The scanning mass range was m/z 43-350. The volatile components of the essential oil were identified by comparing their mass spectral fragmentation patterns with those of analogous compounds in the NIST database and MS data in the literature.

Search and obtaining of *T. urticae*

The mites for the bioassays were obtained from a passion fruit crop (*Passiflora edulis* Sims Passifloraceae) that did not have any treatment against pests. Therefore, the infected leaves were transported to the agroecological pest management laboratory of the Agroecology Center of the Science Institute of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, where the organisms that had the morphological characteristics of *T. urticae* were separated (Ferragut and Santoja, 1989). The separated mites were placed in healthy and clean bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae) inside a transparent acrylic container covered with tricot cloth, kept in conditions of 26 ± 1 °C, and relative humidity of 60 ± 5 %, where they were reproduced for laboratory bioassays.

Mortality bioassay in laboratory

The experimental unit consisted of a 1.5 cm diameter bean leaf disc with a certain number of *T. urticae* eggs, larvae, or adults placed inside a 9 cm diameter Petri dish with the bottom covered with two layers of wet filter paper to saturation. The turgor of the leaf disc was maintained, placing the Petri dish inside a cylindrical polypropylene box 5 cm high by 12 cm in diameter. A clip connected a piece of absorbent material to the Petri dish. Water flow between the Petri dish's filter paper and the outer box's water reservoir was maintained (Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2022). Each treatment had 10 repetitions, and the experimental design was completely randomized.

Preparation of solutions derived from extracts

Solutions were prepared at concentrations of 500, 1000, and 1500 mg·L⁻¹ of each plant extract, and the hydrolyte was used undiluted. Twenty-five mL of each treatment was prepared,

and 0.025 mL of Surfatosol + 6° were added to each one and passed through the Shaker (JT-14[®]) for 10 min to obtain a homogeneous solution. Two controls were included: distilled water and distilled water mixed with surfatosol, to determine any mortality derived from surfatosol.

Evaluation of mortality in eggs

Two females and three males of *T. urticae* were placed in each experimental unit, and oviposition was allowed for 12 hours (to obtain a minimum of 10 eggs per disc). After that time, adults were removed, and the laid eggs were counted and treated with plant extracts at the established concentrations. For its application, a manual sprinkler with a capacity of 25 mL was used to spray the leaf discs homogeneously. Once the discs were treated, they were allowed to dry in the open air for 15 min and placed in the breeding room at 26 ± 1 °C, relative humidity of 60 ± 5 %, and a photoperiod of 12:12 light and dark. The hatching of the eggs was checked 6 d after the application of the treatments. The number of dead and hatched eggs was recorded by direct observation with a Carl Zeiss stereo microscope (Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2022).

Evaluation of mortality in neonate larvae

For this, 120 females and males were collected and placed on bean leaves previously placed in 90 mm diameter Petri dishes with 2 - 3 moist filter paper discs. Females were allowed to lay eggs for 24 h after removing them from the leaves. After 5 d, the eggs hatched, obtaining larvae of homogeneous age (< 12 h). The plant extract was applied to each Petri dish with the help of a manual sprinkler at 10 cm at each concentration established in the treatments. They were dried at ambient temperature, and with the use of a brush of camel hair, the larvae were distributed in foliar discs with 10 larvae per disc. The experimental units were randomly placed in the breeding chamber under controlled conditions of 26 ± 1 °C, 60 ± 5 % relative humidity, and a 12:12 h photoperiod of light and darkness. Dead individuals were counted at the time the first protonymphs were observed (4 d). Those larvae that did not respond with movement when touched three times with the brush were considered dead. Individuals that escaped from leaf discs were not considered for data analysis.

Evaluation of mortality in adult females

The respective treatment was applied to the leaf disc of each experimental unit containing 10 adult females (Figure 1) with the help of a manual sprinkler and allowed to dry under ambient conditions for 15 min. Then, the experimental units were randomly placed in the breeding chamber, where they remained under the already indicated temperature, relative humidity, and photoperiod conditions. Finally, dead mites (those that did not respond to the touch of the brush) were counted at 24 h.

Laboratory repellency bioassays

The experimental unit consisted of a leaf disc sectioned into two equal parts. One section was submerged for 10 seconds in a solution of 25 mL of distilled water and 0.025 mL of sur-

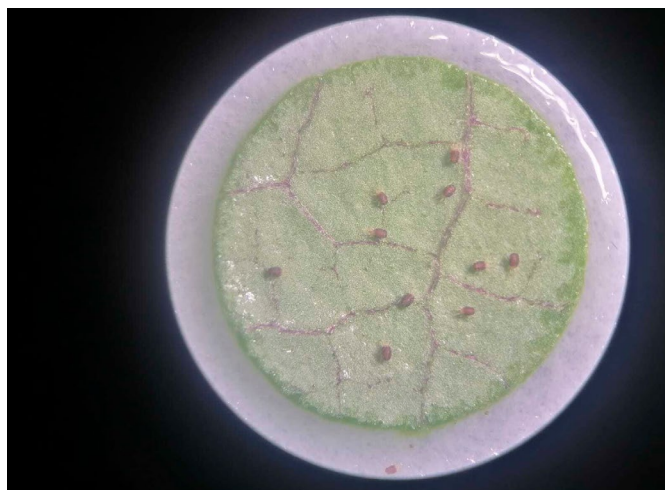


Figure 1. *T. urticae* females on leaf disc.

Figura 1. Hembras de *T. urticae* en disco foliar.

fatosol, while the other section was immersed in the solution with the respective treatment (plant extracts at different concentrations) for 10 sec, both teams were allowed to dry in ambient conditions. Finally, both sections were merged again to form a leaf disc.

Determination of repellency in neonate larvae

The larvae were obtained as previously described. Then, with the help of a camel hairbrush, 10 neonate larvae were placed in each leaf disc of the experimental units of the 10 replicates of each treatment and kept in the breeding chamber with the conditions already described. After 24 h, the number of individuals in each section of the leaf disc was counted, and the repellency percentage was calculated with the following formula (Aissaoui *et al.*, 2019):

$$\% \text{ Repellency} = \frac{(C-T)}{(C+T)} \times 100 \quad (2)$$

Where C is the number of individuals in the control section and T is the number of individuals treated with the extract solution at the respective concentration.

Determination of repellency in adult females

The experimental unit was the one previously described, except that 10 adult females were placed in the leaf disc of the sections with the control treatment and the extract. Each treatment had 10 repetitions in each trial, and the experimental design was completely randomized. The individuals in both sections of the leaf were counted at 24 h, and the percentage of repellency was calculated with the expression indicated above.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of plant extracts

The percentage of the DPPH radical inhibition of the orange peel aqueous plant extract was 8 %. For the *T. havanensis* ethanolic extract, an inhibition percentage of 45 % was

obtained. The results with the extracts of *C. sinensis* have been reported with a low antioxidant activity, possibly due to the limonoid compounds present in the extract (Yu *et al.*, 2005). Likewise, the results are like other reports with a low percentage of inhibition (Kamal *et al.*, 2013). No information was found on the antioxidant activity of the *T. havanensis* extracts, however, in other species, as is the case of the bark and stem of *Trichilia roka* Chiov. (Meliaceae), the obtained percentage of the DPPH radical inhibition ranged from 30 to 40 % (Nana *et al.*, 2013).

The secondary metabolites present in the *C. sinensis* aqueous extract (Table 1) were determined with the data obtained by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The main compound is limonene with 75 %, squalene with 16 %, and the rest corresponds mainly to 7-hydroxy-5,6-dimethoxychromene-2-1;2H-1-Benzopyrane-2-1, β -myrcene, n-hexadecanoic acid, which are attributed to bactericidal and insecticidal properties (Abdelgaleil *et al.*, 2019; Luna-Guevara *et al.*, 2021). The data is consistent with other reports where limonene was the major bioactive compound present in the plant extract of the orange peel. The β -myrcene, the secondary metabolite present in the highest proportion in the plant extract was also reported (Barros-Gomes *et al.*, 2021; Conde-Hernández *et al.*, 2021).

Table 1. Secondary metabolites present in the *C. sinensis* extract sample.
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto de la muestra de *C. sinensis*

Metabolites	Content in the extract (%)
Limonene	75.83
Squalene	16.76
7-hydroxy-5,6-dimethoxychromene-2-1	1.83
beta-mircene	1.29
n-hexadecanoic acid	1.09
Linalool	0.61
Compounds of minor proportion (< 0.6 %)	2.57
Total	99.98

Table 2 shows the results of the chemical characterization of the *T. havanensis* ethanolic extract. As can be seen, the bioactive compounds present in the plant belong to a complex mixture made of esters, mainly acetates. Thymol is the primary compound with 13.97 %, followed by linoleic acid at 11.99 % and (-) Spathulenol at 11.67 %. The rest are compounds at less than 9 %, which are precursors for the limonoids formation of the azadiron, cedrelone, havanensin, trichilin, trichilinin, and vilasinin class, which have been reported in plants belonging to the *Meliaceae* family and constituents of the *T. havanensis* plant extract. The formation of these limonoids is conditioned by contact with light, temperature, as well as by the medium used, as Tang and Luo (2011) reported that the formation of havanensin is carried out under acidic conditions. On the other hand, reports of some other species belonging to the *Trichilia* genus have been found such as *Trichilia emética* Vahl (Meliaceae), whose

Table 2. Secondary metabolites present in *T. havanensis* ethanolic extract.
Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en la muestra del extracto etanolico de *T. havanensis*.

Metabolites	Content in the extract (%)
Tymol	13.97
Linoleic acid	11.99
(-) Spathulenol	11.67
B-cubenene	8.11
n-hexadecanoic acid	3.54
Aromadendrene	3.45
Ylangene	3.38
Gamma-murolene	2.9
Gemma-cadinene	2.62
Acetic acid	2.33
Aromadendrene oxide (2)	2.24
Compounds of minor proportion (<2 %)	21.77
Total	95.78

main constituents are esters and aromatic compounds such as pentanoic acid and p-xylene (Perumal *et al.*, 2020). In the case of *Trichilia gigliana* Vahl (Meliaceae), several terpenes and esters have been reported such as hexadecanoic acid ethyl ester or octadecane, 2-methyl, which are also present in the *T. havanensis* extract used (Lucie *et al.*, 2016).

Mortality evaluation in laboratory tests

The average mortality percentage was less than 5 % and no significant difference was observed between the median mortality of the control treatments consisting of distilled water (A) and distilled water mixed with surfatol (S), control A, and control S (Mann and Whitney, $p > 0.05$). Therefore, the analyzes were carried out with the original mortality data, and the repetitions of the two controls were joined to consider a single control.

Determination of egg mortality

The *T. havanensis* seeds ethanolic extract at 1500 mg·L⁻¹ was the treatment with the highest ovicidal activity in *T. urticae*, with a median egg mortality of 45.0 %, which was significantly higher than the mortality of the other treatments and of the control (Table 3). The ovicidal effect on *T. urticae* has been previously reported in ethanolic extracts of *T. havanensis* (Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2022). Also, the extract from the seeds of *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae), belonging to the same family as *T. havanensis* was effective on females and the viability of *T. urticae* eggs at concentrations of 1 % (Maldonado-Michel *et al.*, 2022). The ovicidal effect can be attributed to the compounds obtained from the plant extract, such as thymol. The lipophilicity of this compound allows it to easily cross the cuticle and enter inside the egg. It can cause an alteration of the cell function and can interact with the cholinergic system which affects the development of the mite (Jukic *et al.*, 2007).

Table 3. Median mortality (M) of *Tetranychus urticae* eggs treated with *Citrus sinensis* and *Trichilia havanensis* extracts.

Tabla 3. Medianas de mortalidad (M) de huevecillos de *T. urticae* tratados con los extractos de *C. sinensis* y *Trichilia havanensis*.

Treatments	<i>C. sinensis</i>	<i>T. havanensis</i>
	M [LQ, UQ]* (%)	M [LQ, UQ] (%)
Control	00.0 [00.0, 07.2] a**	00.0 [00.0, 07.2] a
Hydrolate	16.0 [06.7, 18.7] bc	08.8 [00.0, 26.7] ab
500 mg·L ⁻¹	11.2 [00.0, 14.3] b	22.0 [18.2, 31.2] b
1000 mg·L ⁻¹	14.4 [08.3, 25.0] bc	18.9 [11.8, 24.0] b
1500 mg·L ⁻¹	17.5 [11.1, 26.7] c	45.0 [37.5, 55.6] c

*LQ = Lower quartile, UQ = Upper quartile.

**Different letters indicate significant differences between treatment medians (p<0.05).

The extract and the hydrolate from the *C. sinensis* peel caused egg mortality between 11.2 % and 17.5 %, with a significant difference compared to the mortality of the control treatment. The highest mortality treatments were with extracts at 1000 and 1500 mg·L⁻¹, and the hydrolate, with a median mortality of 14.4 %, 17.5 %, and 16.0 %, respectively, without difference (p>0.05) between them. Unfortunately, no information was found in the scientific literature on the ovicidal effect of the *C. sinensis* plant extract on *T. urticae* or on other mite species. However, its ovicidal effect has been proven in other arthropods such as *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) and *Dermestes maculatus* Deg (Coleoptera: Dermestidae) at concentrations lower than 1 % (Don-Padro, 1996).

Determination of mortality in larvae neonate

Table 4 shows the median mortality caused by the treatments with the two species extracts and the result of the comparison of the medians, where the highest larvicidal activity was caused by the concentrations of 1000 and 1500 mg·L⁻¹ of the *C. sinensis* extract, with a mortality of 40.0 %. Some studies demonstrate the effect of limonene at 80 % has a mortality greater than 50 % at this stage of the mite (Golec *et al.*, 2020). In other mites, such as *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae), the limonene present in the *Plectranthus tomentosa* Forssk (Lamiaceae) extract has a larvicidal effect of 80 % at concentrations of 50 mg·L⁻¹ 48 h after its application (Sun *et al.*, 2022).

Table 4. Median mortality (M) of neonate larvae of *Tetranychus urticae* treated with *Citrus sinensis* and *Trichilia havanensis* extracts.

Tabla 4. Medianas de mortalidad (M) de larvas neonatas de *T. urticae* tratados con los extractos de *Citrus sinensis* y *Trichilia havanensis*.

Treatments	<i>C. sinensis</i>	<i>T. havanensis</i>
	M [LQ, UQ] * (%)	M [LQ, UQ] (%)
Contro	100.0 [00.0, 05.0] a**	00.0 [00.0, 05.0] a
Hydrolate	30.0 [20.0, 30.0] b	20.0 [10.0, 20.0] c
500 mg·L ⁻¹	20.0 [20.0, 30.0] b	15.0 [10.0, 20.0] b
1000 mg·L ⁻¹	40.0 [30.0, 50.0] c	15.0 [10.0, 20.0] b
1500 mg·L ⁻¹	40.0 [30.0, 40.0] c	20.0 [10.0, 30.0] c

*LQ = Lower quartile, UQ = Upper quartile.

**Different letters indicate significant differences between treatment medians (p<0.05)

For *T. havanensis*, the highest larvicidal activity was obtained with the hydrolate and the concentration of 1500 mg·L⁻¹ of the ethanolic extract of seeds, with a mortality of 20 % in both treatments.

Determination of female adult mortality

The highest activity was caused by concentrations of 1000 and 1500 mg·L⁻¹ of the aqueous extract of *C. sinensis*, with a mortality of 45 and 50 %, respectively (Table 5).

The highest activity of the *T. havanensis* seeds ethanolic extract was obtained at concentrations of 1000 and 1500 mg·L⁻¹ with 30 and 35 % mortality, respectively, without a significant difference between them.

The extract of *C. sinensis* showed a higher mortality than the *T. havanensis* extract in female adults. Previous reports evaluated the mortality of *T. urticae* adults in concentrations of 1250, 2500, 5000, and 10 000 mg·L⁻¹ of a *C. sinensis* extract. The most effective treatment was at a concentration of 10 000 mg·L⁻¹ (Hassan *et al.*, 2022). Likewise, the lethality of extract of *C. sinensis* in adults of *T. urticae* with different concentrations were evaluated, and the results obtained demonstrate the acaricidal activity of the *C. sinensis* extract at an 8 % concentration due to the limonene as responsible for the mortality of *T. urticae* (Born *et al.*, 2018; Asmaa and Amal, 2021).

Table 5. Median mortality (M) of adult females of *Tetranychus urticae* treated with *Citrus sinensis* and *Trichilia havanensis* extracts.

Tabla 5. Medianas de mortalidad (M) de hembras adultas de *Tetranychus urticae* tratados con los extractos de *Citrus sinensis* y *Trichilia havanensis*.

Treatments	<i>C. sinensis</i>	<i>T. havanensis</i>
	M [LQ, UQ]* (%)	M [LQ, UQ] (%)
Control	00.0 [00.0, 10.0] a**	00.0 [00.0, 10.0] a
Hydrolate	10.0 [00.0, 20.0] a	05.0 [00.0, 10.0] a
500 mg·L ⁻¹	20.0 [10.0, 30.0] b	10.0 [00.0, 10.0] a
1000 mg·L ⁻¹	45.0 [40.0, 60.0] c	30.0 [30.0, 40.0] b
1500 mg·L ⁻¹	50.0 [50.0, 50.0] c	35.0 [30.0, 40.0] b

*LQ = Lower quartile, UQ = Upper quartile.

**Different letters indicate significant differences between treatment medians (p<0.05)

Laboratory repellency bioassays

Determination of repellency in larvae neonate

The repellency results in larvae are shown in Table 6, where the treatments with the highest repellent activity were the concentrations of 1000 and 1500 mg·L⁻¹ of the *C. sinensis* extract with repellency indices of 20 and 30 %. This extract's concentration of 500 mg·L⁻¹ caused 20 % attracting activity for the larvae. In comparison, the hydrolate caused a low repellency (10 %) that was not significantly different from that observed with 500 mg L⁻¹ of the extract.

The hydrolate and the different concentrations of the *T. havanensis* seeds ethanolic extract did not cause a repellent effect on the *T. urticae* larvae. The highest repellent activity was 20 % with the extract at 1000 mg L⁻¹, an activity that was not significantly different from that observed with the other treatments.

Table 6. Median repellency (M) in neonate larvae of *Tetranychus urticae* treated with *Citrus sinensis* and *Trichilia havanensis* extracts.

Tabla 6. Medianas de repelencia (M) en larvas neonatas de *Trichilia havanensis* tratados con los extractos de *Citrus sinensis* y *Trichilia havanensis*.

Treatments	<i>C. sinensis</i>	<i>T. havanensis</i>
	M [LQ, UQ]* (%)	M [LQ, UQ] (%)
Hydrolate	10.0 [-60.0, 40.0] a	-20.0 [-40.0, 20.0] a
500 mg·L ⁻¹	-20.0 [-20.0, 00.0] a	00.0 [-20.0, 20.0] ab
1000 mg·L ⁻¹	20.0 [00.0, 20.0] ab	20.0 [00.0, 20.0] ab
1500 mg·L ⁻¹	30.0 [00.0, 40.0] b	00.0 [00.0, 20.0] b

*LQ = Lower quartile, UQ = Upper quartile.

**Different letters indicate significant differences between treatment medians (p<0.05)

Determination of repellency in adult female

The results of the repellency test with adult females are presented in Table 7, where the *C. sinensis* extract show high repellent activity at the concentration of 1000 mg·L⁻¹ with an index of 60 %, equal to the repellency caused by 1500 mg·L⁻¹ of the extract.

In the case of *T. havanensis* (Table 7) there was no significant difference in the repellency of larvae and adults of the two-spotted red mite.

The repellency results showed a higher effect in adult females than larvae stage by *C. sinensis*. This is due to the setae present around the body of the adult stage, which lets the mite detect different types of molecules present in the environment (Tuttle *et al.*, 1976). However, the repellent effect of the plant extract of *C. sinensis* was shown at concentrations of 1 % with a repellency of 60 % in *T. urticae* adults, while at a concentration of 2 %, a repellent effect greater than 50 % was observed (Júnior *et al.*, 2010; Da Camara *et al.*, 2015). Therefore, in the present study, it was possible to determine the repellent activity of the *C. sinensis* extract due to the action of the main limonoids that constitute the plant extract, such as limonene and squalene and possible synergistic activity between them.

On the other side, the extract of *T. havanensis* showed lower mortality and repellence in the larvae and adult stages. This could be due to the proportion of compounds present in the extract which varies depending on the part of the

Table 7. Median repellency (M) in adult female of *Tetranychus urticae* treated with *Citrus sinensis* and *Trichilia havanensis* extracts.

Tabla 7. Medianas de repelencia (M) en hembras adultas de *Tetranychus urticae* tratadas con los extractos de *Citrus sinensis* y *Trichilia havanensis*.

Treatments	<i>C. sinensis</i>	<i>T. havanensis</i>
	M [LQ, UQ] * (%)	M [LQ, UQ] (%)
Hydrolate	- 10.0 [- 20.0, 00.0] a	00.0 [- 20.0, 20.0] a
500 mg·L ⁻¹	00.0 [- 20.0, 20.0] a	- 10.0 [- 40.0, 20.0] ab
1000 mg·L ⁻¹	60.0 [40.0, 80.0] b	10.0 [00.0, 20.0] ab
1500 mg·L ⁻¹	60.0 [40.0, 80.0] b	20.0 [00.0, 40.0] b

*LQ = Lower quartile, UQ = Upper quartile.

**Different letters indicate significant differences between treatment medians (p < 0.05)

plant, stage of maturity, and the drying process (López-Malo *et al.*, 2006). Nevertheless, no registered papers on the use of *T. havanensis* in *T. urticae* were found. Still, in the extract are compounds present in other plants of the meliaceous family, to which acaricidal and repellent properties have been attributed. For example, the ethanolic extract of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) affected the development of mite at a concentration of 4 mg·mL⁻¹ due to the limonoids present in the extract (Ashrafju *et al.*, 2014). On the other hand, the aqueous extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) in tomato crops had a 30 % lethal effect on the larval population of *T. urticae* at 8·g·L⁻¹ (Augustin *et al.*, 2015).

Other studies suggested an acaricidal effect attributed to the secondary metabolite alpha-cubenene, present in extracts of *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), and *T. havanensis* on the two-spotted red mite in its adult state (Chiasson *et al.*, 2001). Besides, there are not enough reports on the repellent activity of the *T. havanensis* extract on mites; recent works evaluated the acaricidal and repellent effect of *Croton spp.* L. (Euphorbiaceae) in adults of *T. urticae*. When carrying out the characterization of the plant, spatulenol (a compound present in the extract of *T. havanensis* used in the present investigation) was identified as the main plant extract compound and responsible for a lethal and repellent effect greater than 50 % in bioassays performed at a concentration of 27.08 µL·mL⁻¹ (Da Camara *et al.*, 2021). Similarly, the thymol compound was evaluated in adults of *T. urticae* and reported repellent activity close to 100 % with concentrations of 10 µL·mL⁻¹ diluted in acetone (Tak *et al.*, 2017).

CONCLUSIONS

As shown in the present work, by studying the interaction of the extract in greenhouse or fields, the vegetal extract of *C. sinensis* and *T. havanensis* current mortality and repellency in the different development stages of *T. urticae* could present an agroecological alternative for the management of pest and reduction of the health and environmental impacts derived from the use of acaricides. Besides, although the *T. havanensis* extract showed less repellency and mortality in larvae and adult females, the higher mortality in eggs suggests that the synergic activity of a *C. sinensis* and *T. havanensis* extracts mixture could present an alternative for the management of any development stage of the red mite in the crops.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a fellowship grant awarded by the PNPC CONAHCYT to the first author.

INTEREST CONFLICT

The authors declare no conflict of interest related to this publication.

REFERENCES

Arenas, C. and Rodríguez-Hahn, L. 1990. Limonoids from *Trichillia havanensis*. *Phytochemistry*. 29: 2953-295.

- Abdelgaleil, S.A., Badawy, M.E., Mahmoud, N.F. and Marei, A.E.S.M. 2019. Acaricidal activity, biochemical effects, and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Pesticide biochemistry and physiology*. 156: 105-115.
- Augustin, G., Kosma, P., Nestor, P. and Tinkeu, L. 2015. Neem seed extract (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae) protects tomato crops (*Lycopersicon esculentum* Miller) (Solanaceae) against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) pests. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4: 190-198.
- Aissaoui, A.B., Zantar, S. and Elamrani, A. 2019. Chemical composition and potential acaricide of *Salvia officinalis* and *Eucalyptus globulus* on *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Journal of Applied Chemistry and Environment Protection*. 4: 1-15.
- Asmaa, A. and Amal, A. 2021. Efficacy of the volatile oils of the peels of two types of citrus fruits on spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae) and mite (*Phytoseiulus persimilis* Athias-Henroit) (Acari: Phytoseiidae). *Arabian Journal of Scientific Research*. 4: 1-7.
- Ashrafju, M., Ahmadi, K. and Hamidi, H. 2014. Different concentrations of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) ethanolic extract on the developmental time and egg laying of *Tetranychus urticae* Koch. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47: 2242-2247.
- Barros-Gomes, P.R., de-Assunção, G.V., Oliveira-Everton, G., Souza-de-Lima, H., Fernandes-de Araújo, J.R., Fonseca-Silva, E. and Mouchrek-Filho, V.E. 2021. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 50: 48-60.
- Blanco-Muñoz, J., Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., González-Alzaga, B., Bassol, S., Cebrian, M.E., López-Carrillo, L. and Aguilar-Garduño, C. 2016. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 243: 19-26.
- Born, F.D.S., da Camara, C.A.G., de Melo, J.P.R. and de Moraes, M.M. 2018. Acaricidal property of the essential oil from *Lippia gracilis* against *Tetranychus urticae* and a natural enemy, *Neoseiulus californicus*, under greenhouse conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 75: 491-502.
- Centre for Agricultural Bioscience International. 2018. *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite). [Accessed 19 May 2023] Online: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompdiem.53366>.
- Chan, W.R., Gibs, J.A. and Taylor, D.R. 1973. Triterpenoids from *Trichillia havanensis* Jacq. Part. I. The acetates of havenensis and Trichilenone, New Tetracarboxylic Tetranortriterpenes. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans*. 10:1047-1050.
- Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C. and Poliquin A. 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology*. 94: 167-171.
- Conde-Hernández, L.A., Botello-Ojeda, A.G., Alonso-Calderón, A.A., Osorio-Lama, M.A., Bernabé-Loranca, M.B. and Chavez-Bravo, E. 2021. Optimization of extraction of essential oils using response surface methodology: A review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 24: 937-982.
- De Santana, M.F., Câmara, C., Monteiro, V.B., de Melo, J.R. and de Moraes, M.M. 2021. Bioactivity of essential oils for the management of *Tetranychus urticae* Koch and selectivity on its natural enemy *Neoseiulus californicus* (McGregor): A promising combination for agroecological systems. *Acarology*. 61: 564-576.
- Da Camara, C.A., de Araujo, C.A., de Moraes, M.M., de Melo, J.P. and Lucena, M.F. 2021. New sources of botanical acaricides from species of *Croton* with potential use in the integrated management of *Tetranychus urticae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 20: 244-259.
- Da Camara, C.A.G., Akhtar, Y., Isman, M.B., Seffrin, R.C. and Born, F.S. 2015. Repellent activity of essential oils from two species of *Citrus* against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*. 74: 110-115.
- Don-Padro, K.N. 1996. Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citrus peel essential oils. *Pesticide Science*. 46: 71-78.
- Escobar, A., Perez, M., Romanelli, G. and Blustein, G. 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*. 13: 9243-9269.
- Ferragut, F. and Santonja, M. 1989. Taxonomía y distribución de los ácaros del género *Tetranychus* Dufour 1832 (Acari: Tetranychidae), en España. *Boletín de Sanidad Vegetal*. 15: 271-28.
- Flores-Villegas, M., González-Laredo, R., Prieto-Ruiz, J., Pompa-García, M., Ordaz-Díaz, L. and Domínguez-Calleros, P. 2019. Eficiencia del extracto vegetal de *Datura stramonium* L. como insecticida para el control de la mosca sierra. *Madera y bosques*. 25: e2511642.
- Golec, J.R., Hoge, B. and Walgenbach, J.F. 2020. Effect of biopesticides on different *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) life stages. *Crop Protection* (Guildford, Surrey). 128: 105015.
- Hassan, M.F., El-Badawy, S.S., Draz, M.G. and Ibrahim, E.S. 2022. New acaricidal activities and chemical compositions of orange oil and extracts of (wild mint and henna) against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 54: 1848-1863.
- Hernández-Antonio, A. and Hansen, A. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 27: 115-127.
- Jaramillo, B.E., Duarte, E. and Delgado, W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17: 54-64.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., and Milos, M. 2007. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*. 21: 259-261.
- Júnior, C.P.A., Gomes-da Camara, C.A., Neves, I.A., de-Carvalho-Ribeiro, N., Gomes, C.A., Martins de Moraes, M. and de-Sousa-Botelho, P. 2010. Acaricidal Activity against *Tetranychus urticae* and Chemical Composition of Peel Essential Oils of Three Citrus Species Cultivated in NE Brazil. *Natural Product Communications*. 5: 471-476.
- Kamal, G.M., Ashraf, M.Y., Hussain, A.I., Shahzadi, A., and Chughtai, M.I. 2013. Antioxidant potential of peel essential oils of three Pakistani citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pakistan Journal of Botany*. 45: 1449-1454.

- López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R., and Alzamora, S. M. 2006. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. In *Advances in food mycology*: 261-286.
- López-Olguín, J.F., Budia, F., Castañera, P. and Viñuela, E. 1997. Actividad de *Trichillia havanensis* Jacq. (Meliaceae) sobre las larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*. 23: 3-10.
- Lucie, A., Wango, S.P., Ephrem, K., Namkossere, S., Bolevane-Ouatinam, S.F. and Lakouetene, D.P. 2016. The effective insecticidal activity of the two extracts ethyl acetate and hexane of *Trichilia gilgiana* against *Sitophilus zeamais*. *International Journal of Biology*. 8: 23-31.
- Luna-Guevara, J.J., Rivera-Hernández, M., Arenas-Hernández, M.M.P. and Luna-Guevara, M.L. 2021. Effect of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) in the vapor phase on the antimicrobial and sensory properties of a meat emulsion inoculated with *Salmonella enterica*. *Food Research*. 5: 306-312.
- Maldonado-Michel, M.A., Muñoz-Valencia, R., Peraza-Campos, A.L., Parra-Delgado, H. and Chan-Cupul, W. 2022. Acaricidal, ovicidal and fago-inhibition activities of seed extracts from *Swietenia humilis* against *Tetranychus urticae* under laboratory conditions. *Industrial Crops and Products* 177: 114494.
- Meza-Ipanaqué, E.I. 2017. Extracción y evaluación del aceite esencial de las cáscaras de la naranja dulce (*Citrus sinensis*). Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas).
- Nana, O., Momeni, J., Tepongning, R.N. and Ngassoum, M.B. 2013. Phytochemical screening, antioxidant and antiplasmodial activities of extracts from *Trichilia roka* and *Sapium ellipticum*. *The Journal of Phytopharmacology*. 2: 22-29.
- Páramo, G., Corredor, D. and Sánchez, M. 1986. Tabla de vida y parámetros poblacionales fundamentales de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) sobre *Rosa sp.* en condiciones de laboratorio. *Agronomía Colombiana*. 3: 83-96.
- Perumal, A., Krishna, N., Babu, S., Pillay, K. and Govender, P. 2020. Phytochemical composition and biological investigation of *Trichillia emetica* Vahl. seed extracts. *Letters in Applied NanoBioScience*. 9: 1111-1116.
- Rodríguez-Cabrera, M., Pérez-Torres, B., Aragón-García, A., Ortiz-García, C., Marco-Mancebón, V. and López-Olguín, J. 2022. Evaluation of ovicidal activity of plant extracts on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 39: 1-16.
- Santamaria, M.E., Arnaiz, A., Rosa-Díaz, I., González-Melendi, P., Romero-Hernandez, G., Ojeda-Martinez, D.A. and Diaz, I. 2020. Plant defenses against *Tetranychus urticae*: mind the gaps. *Plants*. 9: 464.
- StatPoint Technologies Inc. 2009. STATGRAPHICS® Centurion XVI User Manual.
- Sun, Y., Liu, T., Sun, C. and Luo, Q. 2022. Chemical Constituents of *Plectranthus tomentosus* extract and Its Control Effect on *Tetranychus kanzawai*. *Journal of Chemistry*. 2022: 1-6.
- Tak, J.H. and Isman, M.B. 2017. Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*. 108: 786-792.
- Tang, Q.G. and Luo, X.D. 2011. Meliaceous limonoids: chemistry and biological activities. *Chemical Reviews*. 111: 7437-7522.
- Tuttle, D. M., Baker, E. W., and Abbatiello, M. J. 1976. Spider mites of Mexico (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*. 2: 1-102.
- Villavicencio-Nieto, M.Á., Pérez-Escandón, B.E. and Gordillo-Martínez, A.J. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*. 30: 193-238.
- Wu, M., Adesanya, A.W., Morales, M.A., Walsh, D.B., Lavine, L.C., Lavine, M.D. and Zhu, F. 2019. Multiple acaricide resistance and underlying mechanisms in *Tetranychus urticae* on hops. *Journal of Pest Science*. 92: 543-555.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R.L., Mille, E.G., Pike, L.M. and Patil, B.S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53: 2009-2014.

Extractos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. y su efecto alelopático sobre arvenses

Ipomoea batatas (L.) Lam. extracts and their allelopathic effect on weeds

Ricardo Hernández Pérez^{1*} , Alfredo Olarte Paredes¹, Brayert Vladimir Briones Tellez¹, René Salgado Delgado¹, Areli M. Salgado Delgado¹, Maykel Hernández Aro²

¹ Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Zacatepec. Col. Center, # 27. Zacatepec, Morelos. C.P. 62780, México.

² Post-Doctoral. (CEPROBI). Instituto Politécnico Nacional. Car. Yautepec-Jojutla, 6.8, San Isidro, Yautepec. Morelos. C.P. 62730, México.

RESUMEN

Muchos de los metabolitos secundarios que se sintetizan en plantas tiene efectos alelopáticos. Tales aleloquímicos, son excretados por diferentes vías y llegan a estimular, retrasar o inhibir eventos como germinación, crecimiento o desarrollo otras plantas aledañas, fenómeno alelopático que tiene una especial atención en los últimos años, en agroecología, por evidentes propiedades herbicidas. Algunos estudios, han permitido el desarrollo de nuevo bioherbicidas para el control de arvenses, en sustitución de herbicidas sintéticos. El objetivo de estos ensayos fue evaluar el efecto alelopático de extractos acuosos y etanólicos de *Ipomoea batatas* a diferentes concentraciones (0, 1, 2 y 3.33 %) sobre plantasceptoras: *Amaranthus hypochondriacus* y *Portulaca oleracea* en condiciones controladas, tomando como variables respuesta; la germinación total (GT), índice de velocidad de germinación (IVG) y longitud radicular (LR). Los resultados mostraron que los extractos acuoso pH 7 no tuvieron efecto sobre la germinación de *A. hypochondriacus*, observándose un ligero retraso en la velocidad de germinación y efecto estimulante en la longitud radicular a concentraciones de 2 y 3.3 %. Cuando se probó el extracto acuoso a pH 5, se evidenció efecto inhibitorio significativo en las tres variables respuesta, lo cual aumentaba con la concentración sobre lasceptoras, siendo más sensible en *P. oleracea*. Similar resultado se obtuvo con el extracto etanólico, donde el efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración y *A. hypochindriacus* la especie más sensible hasta llegar a una inhibición del 100 % de la germinación incluso con la dosis más baja.

Palabras clave: aleloquímicos, alelopatía, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus hypochondriacus*, especiesceptoras.

ABSTRACT

Many secondary metabolites that are synthesized in plants have allelopathic effects. Such allelochemicals are excreted by different routes and come to stimulate, delay or inhibit events such as germination, growth or development of other neighboring plants, an allelopathic phenomenon that has received special attention in recent years in agroecology due to its evident herbicidal properties. Some studies have allowed the development of new bioherbicides for control of weeds, replacing synthetic herbicides. The objective of these

trials was to evaluate the allelopathic effect of aqueous and ethanolic extracts of *Ipomoea batatas* at different concentrations (0, 1, 2 and 3.33 %) on acceptor plants as: *Amaranthus hypochondriacus* and *Portulaca oleracea* under controlled conditions, taking as response variables total germination (GT), germination speed index (IVG) and root length (LR). The results showed that aqueous extracts at pH 7, had no effect on the germination of *A. hypochondriacus*, observing a slight delay in the speed of germination and a stimulating effect on root length at concentrations of 2 and 3.3 %. When the aqueous extract at pH 5 was tested, a significant inhibitory effect was evidenced in the three response variables, which increased with the concentration on the acceptors, being *P. oleracea* more sensitive. A similar result was obtained with the ethanolic extract, where the inhibitory effect was dependent on the concentration and *A. hypochindriacus* the most sensitive species until reaching 100 % germination inhibition even with the lowest dose.

Keywords. Allelochemicals, allelopathy, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus hypochondriacus*, acceptor species.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen innumerables razones que sustentan el interés por los bioherbicidas, por un menor daño medioambiental y toxicológico (González, 2009). Muchas especies de plantas producen considerable cantidad de compuestos biológicamente activos que afectan directa o indirectamente las interacciones planta-planta y planta-animal en un mismo hábitat (Lines y Fournier, 1979). Durante los últimos cincuenta años el uso continuo y desmedido de compuestos químicos sintéticos bajo sistemas de producción agrícola, han generado contaminaciones al medio ambiente, acelerando la erosión del suelo, deteriorando las fuentes hídricas, inclusive influyendo de manera negativa en la salud humana y biodiversidad (Trujillo, 2008; Hernández *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2015), siendo el centro de atención de muchos especialistas, principalmente en la rama agrícola (Espejo *et al.*, 2010). Una alternativa prometedora, son las alelopatías, que en una agricultura sustentable permiten un equilibrio ecológico (Torres *et al.*, 2003).

(Sampietro, 2003) relacionó la alelopatía como un fenómeno biológico en el que un tipo de organismo sin-

*Autor para correspondencia: Ricardo Hernández Pérez
 Correo-e: jsantaclara57@yahoo.es

Recibido: 21 de diciembre de 2022

Aceptado: 10 de octubre de 2023

Publicado: 13 de noviembre de 2023

tetizan varios componentes químicos (aleloquímicos) que intervienen en la reproducción, crecimiento, desarrollo o supervivencia de organismos diferentes. Los aleloquímicos pueden implicar resultados beneficiosos, lo que se le conoce como aleopatía positiva, así como resultados nocivos a los organismos aceptores, lo que se conoce como aleopatía negativa.

Krautmann *et al.* (2001) comprobaron que el efecto alelopático positivo, se manifiesta cuando la especie vegetal influye, específicamente cuando hay estimulación de los procesos vitales de la especie aceptora. Mientras, el efecto negativo se presenta cuando los metabolitos secundarios de la planta donante, afectan significativamente los mismos procesos vitales en la planta aceptora, ocasionando hasta la muerte de la aceptora. Aunque, existe la posibilidad de que simplemente sea indiferente, cuando no influyen sobre el desarrollo de la planta invasora. Tales efectos se basan en el comportamiento de cada aceptor frente a los agentes alelopáticos.

Los aleloquímicos expulsado, juegan un papel decisivo sobre todo en prácticas agroecológicas, reflejándose directamente sobre los rendimientos de las plantas cultivadas (Albuquerque *et al.*, 2011). De hecho, el proceso o mecanismo evolutivo (selección natural) es el resultado de la competencia entre genotipos estrechamente relacionados (Margalef, 1980) citado por Anaya *et al.* (2016).

Actualmente se conocen más de 15,000 metabolitos secundarios con diferentes propiedades químicas. De estos un gran número poseen carácter alelopático (Cárdenas, 2014). Por lo que el objetivo del ensayo fue evaluar el efecto alelopático de extractos acuosos y etanólicos de *I. batatas*, sobre plantas aceptoras de *A. hypochondriacus* y *P. oleocarea*, a diferentes concentraciones bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el departamento de postgrado (DEPI) del Instituto Tecnológico de Zacatepec, estado de Morelos, México.

Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron donadas por el Dr. Hernández, investigador postdoctoral del (CEPROBI)/ Instituto Nacional Politécnico, México. mientras que las semillas de plantas fueron adquiridas comercialmente.

Se colectaron en campo plantas de *I. batatas* de las que se seleccionaron hojas y tallos, las que fueron secadas al sol durante 15 días hasta lograr una deshidratación total. La biomasa fue molida en licuadora y luego tamizada (malla 50), hasta lograr suficiente material para los ensayos, el cual fue almacenado en bolsas ziploc y recipiente de plástico, etiquetados y mantenidos en oscuridad a baja humedad H.R.

Método de extracción (sólido-líquido)

Para la obtención de extractos se maceró la biomasa en la relación 1:30 p/v agitación constante según la metodología de (Hernández *et al.*, 2015), formándose dos tipos de extractos (acuoso y etanólico). La extracción acuosa se formuló según lo descrito por Hernández *et al.* (2017), a partir de 5 g de biomasa molinada tamizada y disuelta en 150 mL

de agua destilada estéril a pH de 7.0. La mezcla fue homogenizada bajo agitación constante (300 rpm/ 24 h.) y en oscuridad a temperatura (22 ± 2°C). Luego la mezcla se filtró, por gasa doble y posteriormente el líquido se filtró al vacío. La concentración máxima del extracto fue ajustada a (3.33 %), a partir de la cual se prepararon las fracciones diluidas a concentraciones de 1 y 2 %. Luego se ajustó pH en rango de 6 -7.2. Finalmente, los recipientes de cristal rotulados, fueron conservados a 4 °C en oscuridad hasta su uso. La extracción etanólica, fue preparada con 5 g de biomasa en etanol absoluto (96 - 98 %) en relación 1:30 p/v, agitación constante a (300 rpm/24 h) a temperatura ambiente y en oscuridad. Las soluciones formadas, siguieron la misma preparación que el extracto acuoso, con máxima concentración (3.33 %) y partiendo de esta se prepararon 1 y 2 %, agregando el disolvente en las proporciones requeridas y finamente se llevaron a pH 7. Los recipientes se sellaron y se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Un control positivo con biomasa de *I. batata*, gentilmente cedida por Hernández (2017), conformó un extracto referenciado al (3.33 %) en relación 1:30 (soluto/solvente). Este tuvo la misma preparación que los extractos antes mencionados, partiendo de 3 gramos de dicha biomasa y preparada al momento de ser requeridos en cada ensayo.

Los bioensayos de laboratorio fueron realizados en placas de Petri estériles, según lo descrito por (Rodríguez *et al.*, 2014; Hernández, 2015). En cada bioensayo se usó un diseño de bloques completamente al azar, formado por cinco tratamientos, que incluyó cuatro concentraciones de extracto (tratamientos) con tres repeticiones. Además de establecer un control con agua estéril y un control positivo dosis (3.33 %). La unidad experimental fue una placa de Petri con 24 semillas de las especies receptoras para un total de 72 semillas por tratamiento (Tabla 1).

Para verificar el efecto de los extractos, se evaluó el número de semillas germinadas, cada día hasta el cuarto día, considerándose semilla germinada, cuando la radícula alcanzó un mínimo (0.5 - 1 mm). Para observar la germinación de semillas se utilizó una lupa de 8.5 cm Ø.

A partir de esto, se calculó la Germinación Total (GT) y el Índice de velocidad de germinación (IVG) en cada trata-

Tabla 1. Diseño experimental general y resumido para los bioensayos.

Table 1. General and summary experimental design for bioassays.

Tipo de extracto	Tratamientos	Dosis /Conc.	Volumen asperjado	Total de UE	No. de semillas por UE
Acuoso (EA)	T0 (Control -)	0 % p/v	5 mL	15	24
	T1	1 % p/v			
	T2	2 % p/v			
	T3	3.33 % p/v			
	T4 (Control +)	3.33 % p/v			
Etanólico (EE)	T0 (Control -)	0 % p/v	5 mL	15	24
	T1	1 % p/v			
	T2	2 % p/v			
	T3	3.33 % p/v			
	T4 (Control +)	3.33 % p/v			

miento. Así mismo, se tomaron al azar 10 plantas por cada unidad experimental (30 plantas) por tratamiento, a las que se les midió la longitud radicular (LR) (cm), con ayuda de una regla. Las ecuaciones registradas fueron:

Germinación Total (G_T) (Hernández et al., 2017)

Formula: $G_T = [N_T \times 100] / N$

Donde:

N_T : Número de semillas germinadas en la última evaluación del experimento.

N : Número de semillas utilizadas en el bioensayo.

Índice de Velocidad de Germinación (IVG) (Hernández et al., 2015)

Formula: $IVG = G_1 / N_1 + G_2 / N_2 + \dots + G_n / N_n$

Donde:

G_1, G_2, G_n : Número de semillas germinadas, en el primer, segundo, hasta el último conteo.

N_1, N_2, N_n : Tiempo en días desde el primer, segundo, hasta último conteo.

Longitud radicular (Pereira et al., 2019).

Los datos registrados con las variables respuesta, germinación total (GT), índice de velocidad de germinación (IVG) y longitud radicular (LR), fueron procesados en un análisis de varianza (ANOVA). Previo a la verificación de los supuestos de homogeneidad de la varianza, acompañado de una prueba Tukey ($\alpha \leq 0,05$), para determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos. Previo a cada bioensayo se verificó la viabilidad de las semillas de cada especie aceptora, garantizando un máximo de germinación superior al 80 %, según Zamorano y Fuentes (2005).

Bioensayos

Cuatro bioensayos se ejecutaron, utilizando los extractos acuosos pH 7 y pH 5, con la especie aceptora *A. hypochondriacus* o *P. oleracea* en placas de Petri. El papel absorbente (sanitas) sirvió para formar una cámara húmeda. Se usaron 24 semillas por placa y se les asperjó 5 mL del extracto, o solo agua en el caso del control absoluto. Se mantuvieron entre 3 – 4 días (72 horas) para garantizar la germinación de las semillas y si formaban plantas de buen tamaño. A cada placa se les añadió 1.0 mL de agua destilada estéril cada día para humedecer el papel absorbente. Se estableció el control del fotoperiodo con un sensor ajustando 16 h luz y 8 h oscuridad a temperatura ambiente de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$. Los otros dos bioensayos fueron usando extracto etanólicos pH 5.0, con las mismas especies de *A. hypochondriacus* o *P. oleracea* en placas de Petri, aplicado las dosis (0,1,2 y 3.33 %) y un control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad alelopática del extracto acuoso de *I. batatas* con un pH ligeramente alcalino sobre semillas de *A. hypochondriacus*.

La germinación de *A. hypochondriacus* no se vio afectada por ninguna de las concentraciones, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$), el extracto no influyó en el proceso fisiológico de germinación (GT) (Tabla 2). Por otro

lado, el índice de velocidad de germinación (IVG), evidenció un ligero retraso en la cantidad de semillas germinadas/día de un tratamiento a otro, se demostró algunas diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 2. Influencia de las diferentes concentraciones de extracto acuoso de *I. batatas* con un pH ligeramente alcalino sobre *A. hypochondriacus*. Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, según prueba Tukey ($p < 0.05$).

Table 2. Influence of the different concentrations of *I. batatas* aqueous extract with a slightly alkaline pH on *A. hypochondriacus*. Equal letters do not differ significantly between treatments, according to the Tukey test ($p < 0.05$).

Tratamientos	N	GT (%)	IVG (semillas/día)	N	LR (cm)
T0 (Control)	3	94.44 a	23.556 a	30	2.487 c
T1 (1 % p/v)	3	88.89 a	20.44 ab	30	3.843 b
T2 (2 % p/v)	3	91.70 a	21.33 a	30	4.283 ab
T3 (3.33 % p/v)	3	88.89 a	19.278 ab	30	5.130 a
T4-C+ (3.33 % p/v)	3	88.89 a	14.28 b	30	4.097 b
D. E		7.05308	2.44760		1.19136

Fue más notable el efecto alelopático positivo sobre la longitud radicular de la misma especie aceptora, en el tratamiento 3.33 % donde se aplicó una concentración de (3.33 %) de extracto acuoso. Lo que influyó relativamente mejor en esta variable. Aunque en realidad el tratamiento (2 %), donde se aplicó una concentración de (2 %) y el tratamiento (3,33 %) no difirieron, por lo que ambas concentraciones estimularon considerablemente la longitud de la radícula (LR) en comparación con el tratamiento control, aunque de hecho el efecto estimulante se evidenció a partir de la menor dosis (1 %).

Resultados similares obtuvo Silva (2013) cuando utilizó lixiviados acuosos (pH 7.2) a partir de diferentes tejidos secos de zacate (*P. ciliare*). Tales lixiviados no generaron inhibición en la germinación de *A. hypochondriacus* entre 24 y 48 horas, con germinación cercana al 100 %. Solo hubo efecto en el tamaño de la radícula en la misma especie, durante las primeras 24 horas, pero no se mantuvo al llegar a las 48 horas. González (2011), quien aplicó extracto acuoso de *E. gomphocephala* a concentraciones de (10, 30, 50 y 100 %) sobre semillas de *A. hybridus*, observó efectos significativos entre los tratamientos en cuanto a la germinación: Sin embargo, registró un incremento de la germinación de *A. hybridus*, cuando se aplicó extracto en concentraciones altas (50 y 100 %). Según Torres et al. (2003), *I. batatas* aplicada directamente al suelo en concentraciones (0, 75 y 100 %) sobre *A. crassipes Schlecht*, mostraron solo una mayor concentración inhibitoria significativamente sobre la germinación, pero sin efecto alguno sobre la altura de las plantas.

Actividad alelopática del extracto acuoso de *I. batatas* con un pH ligeramente ácido sobre semillas de *A. hypochondriacus* y *P. oleracea*

La germinación (GT), el IVG y longitud radicular (LR) de ambas especies fueron afectadas, conforme aumentaba la concentración del extracto, el efecto inhibitorio fue más drástico, sobre todo con la concentración de extracto acuoso más alta (3.33 %), la que correspondió al tratamiento (3.33 %)

y al control (C+). Para ambos tratamientos, no hubo diferencias significativas respecto a las variables respuesta (Tabla 3). Sin embargo, se puede inferir, que la dosis (3.33 %) obtuvo mejores resultados de inhibición, debido a que el extracto acuoso de ese mismo tratamiento, fue obtenido con partes vegetativas del camote, mientras que el extracto acuoso del control positivo se obtuvo a partir de hojas y tallos.

Tabla 3. Influencia de las diferentes concentraciones de extracto acuoso de *I. batatas* con pH ligeramente ácido, utilizando semillas de *A. hypochondriacus*. Medias con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente entre estas. Prueba Tukey ($p < 0.05$).

Table 3. Influence of different concentrations of *I. batatas* aqueous extract with slightly acidic pH, using *A. hypochondriacus* seeds. Means with the same letters in the same column do not differ significantly between them. Tukey test ($p < 0.05$).

Tratamientos	N	GT (%)	IVG (semillas/día)	N	LR (cm)
T0 (Control)	3	94.44 a	36.94 a	15	5.367 ab
T1 (1 % p/v)	3	90.28 a	23.81 b	15	4.087 b
T2 (2 % p/v)	3	84.72 a	11.194 c	15	5.72 a
T3 (3.33 % p/v)	3	9.72 b	1.69 c	15	0.033 c
T4-C+ (3.33 % p/v)	3	56.9 ab	4.64 c	15	0.583 c
D. E		18.7885	4.22224		1.28856

Este efecto pudo atribuirse a compuestos fenólicos presentes en el camote. Al respecto, estudios realizados por Hernández *et al.* (2015), afirmaron que el efecto inhibitorio del camote, está estrechamente relacionado con la parte de la planta que se utilice y el tipo de extracto. Sus resultados, fueron con extracto acuoso de camote *I. batatas* (L.) Lam. (CEMSA 78-354). Cuando aplicaron el extracto sobre semillas de *A. spinosus* y *P. oleracea* a 1 % y el control, obtuvieron efectos tanto de estimulación como de inhibición en dependencia de la parte de la planta utilizada. En el tamizaje fitoquímico los aleloquímicos presentes en camote, como los compuestos fenólicos, estaban concentrados en la inflorecias, seguido del follaje (Figura 1).

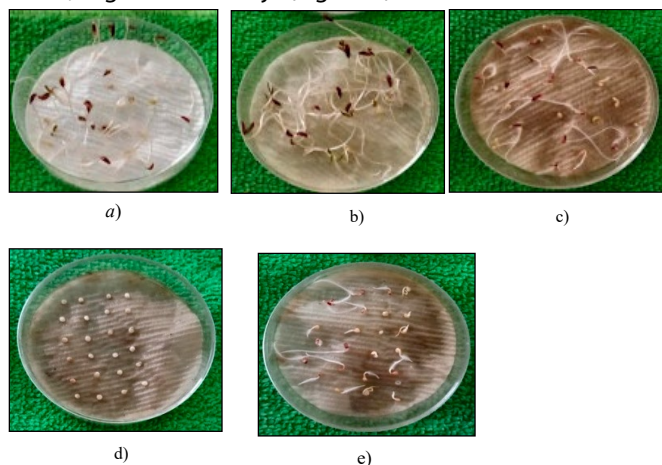


Figura 1. Semillas de *A. hypochondriacus* tratadas con extracto acuoso ligeramente ácido a diferentes concentraciones. Longitud radicular (LR) y velocidad de germinación (IVG), indicadores del efecto inhibitorio. a) Semillas sin tratar; b) dosis 1 % p/v, c) dosis 2 % /v, d) dosis 3.33 % p/v, e) tratamiento Control (+ 3.33 % p/v).

Figure 1. Seeds of *A. hypochondriacus* treated with slightly acid aqueous extract at different concentrations. Root length (LR) and germination speed (IVG), indicators of the inhibitory effect. a) Untreated seeds; b) dose 1 % p/v, c) dose 2 % /v, d) dose 3.33 % p/v, e) Control treatment (+ 3.33 % p/v).

De acuerdo con Latif *et al.* (2017), la actividad alelopática positiva o negativa de los compuestos fenólicos o en general de los aleloquímicos, depende directamente de su concentración, en especial con dosis bajas, que suelen presentar efecto estimulativo. Lo que coincide con los resultados obtenidos para *A. hypochondriacus* y *P. oleracea*, en el caso de germinación, obtenidos a concentraciones de (1 y 2 %), muy cercanos al tratamiento control.

No hubo diferencias significativas entre esos tratamientos, el mejor efecto inhibitorio se mostró hasta la mayor concentración, lo mismo paso con la longitud radicular, en general hubo diferencias significativas entre los tratamientos de ambas especies. En *A. hypochondriacus* la longitud radicular del control fue muy similar a las de dosis menores (1 y 2 %) ya que los valores fueron muy cercanos y en efecto lo fueron, entre el tratamiento (control) y al (1 %) no hubo diferencia ni entre el control y la dosis (2 %), sin embargo, el mejor efecto estimulativo se evidenció con la concentración de 2 %, pero la longitud radicular fue inhibida con el tratamiento aplicado a 3,3 % y el control (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de las diferentes concentraciones de extracto acuoso de *I. batatas* con un pH ligeramente ácido sobre semillas de *P. oleracea*. Medias que no comparten una letra en común son significativamente diferentes según prueba Tukey ($p < 0.05$).

Table 4. Influence of different concentrations of aqueous extract of *I. batatas* with slightly acidic pH, using *A. hypochondriacus* seeds. Means with the same letters in the same column do not differ significantly between them. Tukey test ($p < 0.05$).

Tratamientos	N	GT (%)	IVG (semillas/día)	N	LR (cm)
T0 (Control)	3	86.11 a	42.39 a	15	2.407 a
T1 (1 % p/v)	3	79.17 a	24.97 b	15	3.267 a
T2 (2 % p/v)	3	68.1 a	8.14 c	15	1.150 b
T3 (3.33 % p/v)	3	2.78 b	0.278 d	15	0.00733 c
T4-C+ (3.33 % p/v)	3	4.17 b	0.361 d	15	0.01133 c
D. E		11.3346	2.42030		0.917924

En el caso de *P. oleracea* el mejor efecto positivo radicular ocurrió, con la menor dosis (1 %). La dosis de 2 %, promovió la inhibición considerablemente, en cuanto a la longitud radicular, mientras que de la misma forma se expresó el mejor efecto inhibitorio, con la mayor concentración del extracto.

En cuanto al índice de velocidad de germinación (IVG) para ambas especies, fue muy notorio el retraso de germinación, la cantidad de semillas/día disminuía paulatinamente conforme aumentaba la concentración del extracto y de igual manera hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A grandes rasgos, los resultados indicaron que *P. oleracea* fue la especie de arvense más sensible frente al efecto alelopático del extracto acuoso de *I. batatas*. En relación con esto, Torres *et al.* (2003) mencionó que algunos de los aleloquímicos responsables de los efectos estimulantes y de inhibición se deben a compuestos fenólicos como el ácido cafeico y los flavonoides epigenina y naringenina, encontrados en partes de la planta del camote. Mismos que son estimulantes de las AIA- oxidasa, por lo que reducen los niveles de auxina (AIA) y por ende disminuye el crecimiento.

Por el contrario, derivados fenólicos como el ácido clorogénico y flavonoides como la quercetina y rutina, poseen la capacidad de estimular el crecimiento al inhibir la actividad de las AIA oxidasa. Otros investigadores también han afirmado que en el extracto acuoso de *I. batatas*, están presentes ácidos fenólicos, los cuales son conocidos por inhibir tanto la síntesis de proteínas como de hormonas inclusive tienen la capacidad de modificar la composición ultraestructural celular, la división celular, la estabilidad de la membrana celular, la biosíntesis de clorofila y la absorción de iones (Soni *et al.*, 2019).

Mientras que Hernández *et al.* (2017) comprobaron que la actividad alelopática de esta especie fue detectada mediante un microensayo, lo que corrobora los resultados en estos experimentos.

Por otra parte, recientemente Pérez-Peralta *et al.* (2019) informó también el efecto alelopático de *Ipomoea purpurea* L. Roth una especie cercana a la usada en estos experimentos.

Scavo *et al.* (2019) obtuvieron efecto alelopático similares, con extractos acuosos de hojas de tres variedades de *Cynara cardunculus* L. (alcachofa, cardo cultivado y silvestre), sobre el crecimiento de plántulas de *A. retroflexus* y *P. oleracea*. Estos también, mencionaron que los efectos alelopáticos fueron diferentes en relación al genotipo de las especies aceptoras, siendo *P. oleracea* la más susceptible.

La longitud radicular (LR) fue la variable más afectada en el bioensayo (- 32.6 %). Es importante resaltar que se utilizó una única concentración de los extractos (80 %) y solo se comparó su actividad alelopática respecto al control que fue agua bidestilada (Figura 2).

Sobre los metabolitos secundarios que se identificaron y al que se atribuyó el efecto alelopático fueron: apigenin y lu-

teolin 7-O-glucorodine (solo detectado en el cardo silvestre), apigenin 7-O-glucoside presente en alcachofa, así como también 11,13-dihidro-deacylcynaropicrin y 11,13-dihydroxi-8-deoxygrosheimin (característicos del cardo cultivado) (Scavo *et al.*, 2019).

También El-Shora y El-Gawad (2014), en bioensayos de germinación para evaluar el efecto alelopático de extracto acuoso de (*Lipinus termis* L.) sobre *P. oleracea*, señalaron que el porcentaje de germinación de *P. oleracea* se redujo considerablemente cuando aumentaba la concentración del extracto, las concentraciones que se aplicaron fueron (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 mg/mL), encontraron que el (%) de germinación se redujo alrededor del 78.8 % respectivamente después de aplicar la concentración más alta de extracto acuoso. Sin embargo, los autores no identificaron los aleloquímicos responsables de tal efecto. Resultados similares obtuvo Al-Harbi (2018), al estudiar el efecto alelopático de extractos acuosos de hojas de *Rhanterium epapposum* y *Salsola imbricata* a distintas concentraciones (0, 20, 40 y 60 %) sobre la germinación y longitud radicular y de brotes de dos especies de arvenses (*P. oleracea* y *C. murale*). Se demostró un mayor efecto alelopático negativo en la germinación de *C. murale* cuando se aplicaron los extractos de mayor concentración (40 y 60 %) sin embargo fue más notorio el efecto alelopático negativo a la mayor concentración (60 %) sobre la germinación de semillas de ambas arvenses. También se evidenció que tanto la longitud radicular como la de los brotes de *P. oleracea* fueron más sensibles a la alelopatía del extracto de hoja de *R. epapposum* en comparación con el extracto de hoja de *S. imbricata*.

Actividad alelopática del extracto etanólico de *I. batatas* sobre semillas de *A. hypochondriacus* y *P. oleracea*.

En este último bioensayo se pudo determinar que *A. hypochondriacus* fue mucho más sensible que *P. oleracea* respecto con el extracto etanólico, con evidente efecto alelopático negativo (inhibición) total, en la germinación desde la dosis de (1 %). Solo hubo germinación (GT) en el tratamiento control que fue de 98.61 % (Figura 3).

Sin embargo, para *P. oleracea* el efecto que la inhibición sobre la germinación, tuvo un aumento conforme aumentó la concentración del extracto etanólico, con diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 5).

Al igual que para el IVG el efecto fue inversamente proporcional a la concentración del extracto. La cantidad de semillas germinadas por día, fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración del extracto, en cuanto a la longitud radicular (LR) de esa misma especie de arvense.

También se mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con efecto inhibitorio que comenzó a notarse desde la dosis de 2 %, a 3.33 %, con aumento ligero del tamaño, pero sin diferencias entre los dos tratamientos mencionados (Figura 4).

El mejor efecto inhibitorio resultó cuando se aplicó el tratamiento control (3,33 %), aunque no hubo diferencia con la dosis 2%, mucho mejor tal efecto alelopático negativo, por

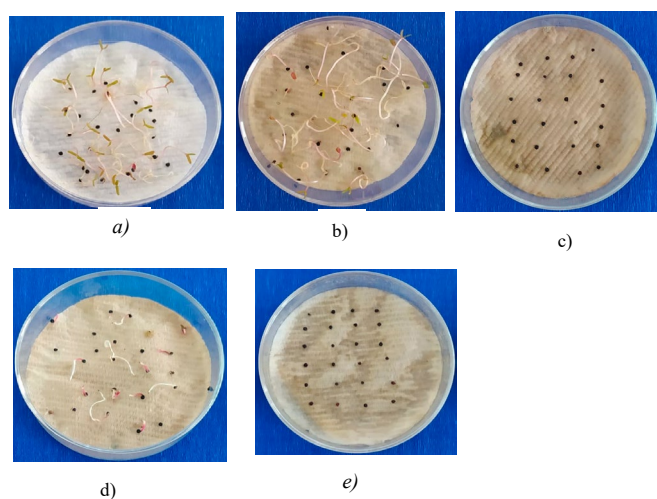


Figura 2. Semillas de *P. oleracea* tratadas con extracto acuoso ligeramente ácido a diferentes concentraciones. Longitud radicular (LR) y velocidad de germinación (IVG), indicadores del efecto inhibitorio. a) Semillas sin tratar: b) dosis 1 % p/v, c) dosis 2 % /v, d) dosis 3.33 % p/v, e) tratamiento Control (+ 3.33 % p/v).

Figure 2. *P. oleracea* seeds treated with slightly acidic aqueous extract at different concentrations. Root length (LR) and velocity indicators of the inhibitory effect. a) Untreated seeds: b) dose 1 % p/v, c) dose 2 % /v, d) dose 3.33 % p/v, e) Control treatment (+ 3.33 % p/v).

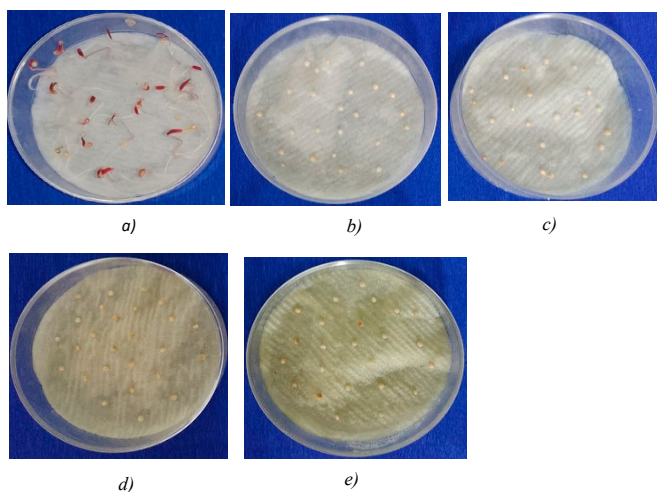


Figura 3. Semillas de *A. hypochondriacus* tratadas con extracto etanólico a diferentes concentraciones. Radículas no visibles en semillas, indican que hubo efecto. a) Semillas sin tratar; b) dosis 1 % p/v, c) dosis 2 % p/v, d) dosis 3.33 % p/v, e) tratamiento Control (+ 3.33 % p/v).

Figure 3. *A. hypochondriacus* seeds treated with ethanol extract at different concentrations. Radicles not visible in seeds indicate that there was an effect. a) Untreated seeds; b) dose 1 % p/v, c) dose 2 % p/v, d) dose 3.33 % p/v, e) Control + (3.33 % p/v).

Tabla 5. Influencia de las diferentes concentraciones de extracto etanólico de *I. batatas* sobre semillas de *P. oleracea*. Medias con letras iguales son significativamente diferentes. Tukey ($p < 0.05$).

Table 5. Influence of the different concentrations of *I. batatas* ethanol extract on *P. oleracea* seeds. Means with the same letters are significantly different. Tukey ($p < 0.05$).

Tratamientos	N	GT (%)	IVG (semillas/día)	N	LR (cm)
T0 (Control)	3	80.56 a	34.11 a	15	3.24 a
T1 (1 % p/v)	3	73.61 a	22.06 b	15	2.787 ab
T2 (2 % p/v)	3	22.2 b	4.11 c	15	1.147 cd
T3 (3.33 % p/v)	3	12.50 b	2.333 c	15	1.767 bc
T4-C+ (3.33 % p/v)	3	2.78 b	0.556 c	15	0.420 d
D. E		9.91865	2.88900		1.14498

otro lado, el tratamiento control, evidenció mejor efecto inhibitorio que el tratamiento (3,33 %), aunque se refiere a una misma dosis, pero con posibles diferencias, con las partes de la planta que se utilizaron para obtener cada extracto.

Los metabolitos implicados con este efecto, posiblemente se encuentren en mayor abundancia en las hojas y tallos, pero en general los resultados del efecto alelopático negativo fueron satisfactorios.

Resultados similares obtuvo Hernández (2016), al evaluar los efectos alelopáticos de extractos acuosos y etanólicos de *I. batatas* (hojas, tallos raíces e inflorescencias) sobre *P. oleracea* y *A. spinosus* a concentraciones de (5 y 10 %). Este mostró un efecto inhibitorio sobre *P. oleracea* con extracto etanólico (5 %) a partir de hojas, al (10 %) con tallos y (10 %) con hojas de camote mostraron diferencias significativas respecto al control y testigo. Por otro lado, no hubo germinación de las semillas de *A. spinosus* (inhibición total) al aplicar las concentraciones (1,5 y 10 %) de extracto etanólico obtenido a partir de hojas, así como también a la concentración de 10 %, a partir de inflorescencias, tallos, corteza y follaje.

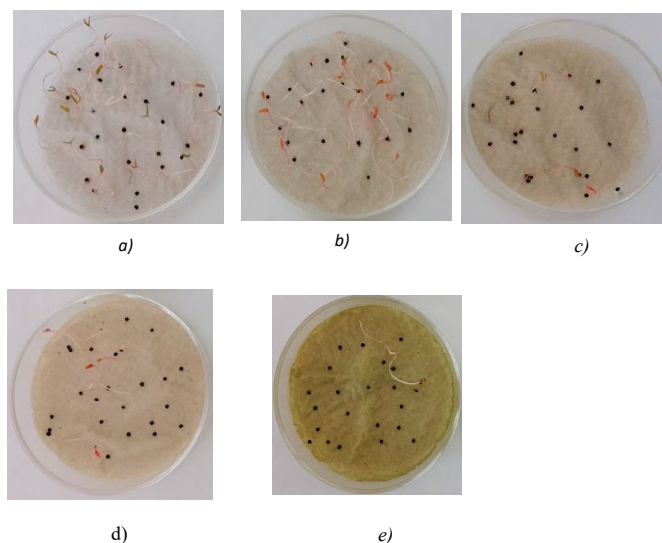


Figura 4. Experimento 5- Semillas de *P. oleracea* tratadas con extracto etanólico a diferentes concentraciones. Radículas visibles en semillas, indican que no hubo efecto. a) Semillas sin tratar; b) dosis 1 % p/v, c) dosis 2 % p/v, d) dosis 3.33 % p/v, e) tratamiento Control (+ 3.33 % p/v).

Figure 4. Experiment 5. *P. oleracea* seeds treated with ethanol extract at different concentrations. Visible radicles in seeds, indicate that there was no effect. a) Untreated seeds; b) dose 1 % p/v, c) dose 2 % p/v, d) dose 3.33 % p/v, e) Control + (3.33 % p/v).

Por otro lado, se han empleado extractos etanólicos de *Tagetes lucida* (pericón) a concentraciones de 100, 630 y 1000 ppm para evaluar la germinación y crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* a partir de un bioensayo en placas de Petri, encontrándose que dicho extracto a la mayor concentración (1000 ppm) inhibió al 100 % la germinación de la arvense antes mencionada (Torres, 2021).

En condición *in vitro* el efecto fitotóxico de extractos de fruto de chile manzano (*C. pubescens*) a diferentes concentraciones sobre *A. hybridus*, mostraron inhibición sobre la germinación, a partir de dosis de 5 % hasta 20 %, con evidente reducción entre 98 - 99 % respectivamente (García *et al.*, 2013), en este caso fueron identificados un alcaloide (capsaicina), implicado en el efecto inhibitorio, junto a la acción sinérgica de diferentes alcaloides.

Según Motmainna *et al.* (2021) los alcaloides actúan inhibiendo la germinación de semillas, así como el crecimiento de algunas plantas, la toxicidad de estos compuestos depende específicamente como en todos los aleloquímicos, de la dosis, además de la sensibilidad de la especie diana, del sitio de acción y sin duda también tiene mucho que ver la etapa de desarrollo del organismo, lo que corrobora los resultados expuestos en los bioensayos etanólicos y acuosos.

En cuanto a *P. oleracea*, Erez y Fidan (2015) obtuvieron resultados muy similares, con el efecto alelopático detectado en extracto etanólico de *Salvia macrochlamys* (hojas y tallos), sobre la germinación de la arvense antes mencionada. En este se informó también, que la germinación fue inhibida cuando se expuso sobre las semillas extracto a concentraciones mayores a 2.5 %, con efecto alelopático negativo, que fue significativamente mayor con el aumento de la concentración (García *et al.*, 2013). Estos infirieron que los esto podía deberse a la alta concentración de compuestos fenólicos y

flavonoides, pero atribuyeron los efectos principalmente, a ácidos grasos presentes en el extracto de *S. macrochlamys*. Y mencionan que los ácidos grasos, podría estar vinculado con la absorción de las semillas, que interfieren enzimas como las lipasas y otras como isocitrato liasa en los cotiledones.

El efecto de un extracto etanólico de *Paspalum maritimum*, obtenido a partir del tallo y raíz de esta contribuyeron a una disminución en la germinación y longitud radicular (LR) en *P. oleracea* (Pereira et al., 2019). Indicando tuvo un efecto específicamente sobre la elongación y división celular, cuanto menor sea el IVG, el tiempo necesario para germinar será mayor. Estos llegaron a la conclusión que el extracto etanólico crudo y las fracciones obtenidas con cloroformo y hexano presentaron mayor capacidad extractiva de los alelo- químico, sin embargo, aunque determinaron el potencial osmótico del extracto etanólico, entre -0.015 y -0.126 MPa, no mencionaron nada respecto al pH.

CONCLUSIONES

Los resultados indicaron que ambos extractos mostraron potencial alelopático sobre las especiesceptoras *A. hypochondriacus* y *P. oleracea*.

Se observó inhibición en la germinación en la longitud radicular y en la tasa de germinación, a medida que la concentración de los extractos aumentaba. El tratamiento 3,33 % fue el que influyó significativamente mejor en cuanto al efecto alelopático negativo.

El efecto dependió en gran medida de la especie aceptora, siendo *P. oleracea* más sensible al extracto acuoso. Mientras que *A. hypochondriacus* mostró mayor sensibilidad respecto al extracto etanólico.

Por lo que, los efectos alelopáticos difirieron entre genotipos, especie donante y especie diana o aceptora.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la dirección TecNM/ del Instituto Tecnológico de Zacatepec y al CONAHCYT por su apoyo en la realización de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

No existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Albuquerque, M., Santos, R., Lima, L., Melo Filho, P. D. A., Custodió Nogueira, R. J. M., Gomes da Câmara, C. A., y Ramos, A. D. R. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 31 (2): 379-395.
- Al-Harbi, N. A. 2018. Allelopathic Effect of Leaf Extract of Two Wild Plants on Seed Germination, Shoot and Root Lengths of Two Weed Species; *Portulaca oleracea* and *Chenopodium murale*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(4), 929-935. <https://doi.org/10.13005/bbra/2704>
- Anaya Lang, A. L., Espinosa García, F. J. y Reigosa Roger, M. J. 2016. Ecología química y Alelopatía: avances y perspectivas. Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
- Cárdenas, C. 2014. Plantas Alelopáticas. Sistemas Inteligentes para Domicilios y edificios. (Vol. 1).
- El-Shora, y El-Gawad. 2014. Evaluation of Allelopathic Effect of White Lupin (*Lupinus termis* L.) Leaf Extract on the Biochemical Dynamics of Common Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Egyptian Journal of Botany*. 54(2): 317-232. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2014.494>
- Flores Córdova, M. A., Sánchez Chávez, E., y Pérez Leal, R. 2015. Potencial Alelopático de extractos foliares de *Astragalus mollissimus* Torr. sobre la germinación in vitro de semillas de maleza. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5):1093-1103. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i5.601>
- García-Mateos, M.R., Sánchez-Navarro, C., Martínez-Solís, J., y Pérez-Grajales, M. 2013. Actividad fitotóxica de los extractos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(4):23-33. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2013000400002&lng=es&tlng=es.
- González, L. E. 2011. Efectos del aceite esencial y extractos acuosos de *Eucalyptus gomphocephala* DC. sobre la germinación y el crecimiento de arvenses. (Máster). Universitat Politècnica de València. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15344/TESINA%20%20FINAL.pdf?sequence=1>
- González, Y. 2009. Propuesta tecnológica para la obtención de extractos con características alelopáticas (Tesis de licenciatura). Universidad Central Marta Abreu de las Villas. <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/1224/Q09032.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Erez, M. E., y Fidan, M. 2015. Allelopathic effects of sage (*Salvia macrochlamys*) extract on germination of portulaca oleracea seeds. *Allelopathy Journal*, 35(2):285-296.
- Espejo, F., Espinosa, R., Puente, M., Cupull, R., y Rodríguez, M. 2010. Efecto alelopático de *Tagetes erecta* L. y *Terminalia catappa* L. sobre *Rhizoctonia solani* (Kühn), 37(2): 89-92. http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V37-Numero_2/ASB1.pdf
- Hernández, M. 2016. Potencial alelopático de *Phylla strigulosa* (M.Mart. & Gal.) Mold., *Sphagneticola trilobata* L. Pruski e *Ipomoea batatas* (L.) Lam sobre arvenses y cultivos. *March*, 57. <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/6881>
- Hernández, M. A., Hernández, R. P., Espinosa, R. R., Guillen, D. S., & Cianna, M. I. 2015. Scientific Communication Allelopathic influence of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. commercial clone' CEMSA 78- 354' on weeds. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 4(10): 657-662.
- Hernández, M., Hernández, R., Guadalupe, G., Guillen, D., y Castellanos, L. 2017. Potencial fitotóxico de extratos de *Ipomoea batatas*, detectado por meio de um novo microbiensaio do tipo sanduiche, em três espécies de plantas daninhas. *Planta Daninha*, 35, 1-9. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100035>
- Hernández, M., Torres, S., y Hernández, R. 2010. Alelopatía de *Wedelia trilobata* e *Ipomoea batatas* sobre malezas y cultivos hortícolas. 6 - 21, May 2014. https://www.researchgate.net/publication/260080422_Alelopatia_de_Wedelia_trilobata_e_Ipomoea_batatas_sobre_malezas_y_cultivos_hortícolas

- Hernández, P. 2017. Efecto de diferentes métodos de control de arvenses en las propiedades del suelo, en plantaciones de teca, *Tectona grandis* (L.f.) (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica. https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/9398/efecto_diferentes_metodos_control_arvenses_propiedades_sielo_plantaciones_teca_tectona_grandis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Krautmann M., Turbay S. y Riscala E. 2001. Efectos alelopáticos de *Tridax procumbens* L; 1-9 .
- Latif, S., Chiapusio, G., y Weston, L. A. 2017. Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.001>
- Lines, N., y Fournier, L. 1979. Efecto alelopático de *Cupressus lusitanica* Mill, sobre la germinación de las semillas de algunas hierbas. *Rev. Biol. Trop.*, 27(2): 223-229. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25652/25981>
- Motmainna, M., Shukor B, A., Uddin, M. K., Binti Asib, N., Mominul Islam, A., y Hasan, M. 2021. Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: A review. *Allelopathy Journal*, 52(1): 21-40. <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2021-52-1-1305>
- Pereira, J. C., Paulino, C. L. A., Endres, L., Santana, A. E. G., Pereira, F. R. S., y Souza, R. C. 2019. Allelopathic potential of ethanolic extract and phytochemical analysis of *Paspalum maritimum* trind. *Planta Daninha*, 37:1-12. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100053>
- Pérez-Peralta, P.J; Ferrera-Cerrato, R; Alarcón, A; Trejo-Téllez L.I; Cruz-Ortega, R; Silva-Rojas, y H.V. 2019. Respuesta del simbiosistema frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y *Rhizobium tropici* CIAT899 ante el efecto alelopático de *Ipomoea purpurea* L. Roth, *Revista Argentina de Microbiología*, 51 (1): 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.006>.
- Rodríguez, M., Chico, J., y Chávez, O. 2014. Efecto alelopático del extracto acuoso de hojas de *Helianthus annuus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Setaria unguolata* y *Chenopodium murale*. *Rebiol*, 34(1): 5-12. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/582/544>
- Sampietro, D. 2003. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. *Fitoquímica Instituto de Estudios Vegetales Dr. Antonio .*, 26. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/19-alelopatia.pdf
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A., Lombardo, S., Roberto Pesce, G., y Mauromicale, G. 2019. Allelopathic potential of leaf aqueous extracts from *Cynara cardunculus* L. On the seedling growth of two cosmopolitan weed species. *Italian Journal of Agronomy*, 14(2): 78-83. <https://doi.org/10.4081/ija.2019.1373>
- Silva, A. 2013. Efecto alelopático de *Pennisetum ciliare* (L.) Link en la germinación y desarrollo inicial de plantas del desierto Sonorense (Tesis de licenciatura). Universidad de Sonora. <http://repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/1106/1/silvafloradanl.pdf>
- Soni, B., Tseng, T.-M. P., y Yue, Z. 2019. Identification and Quantification of Allelochemicals from Selected Sweet Potato (*I. batatas* L.) Cultivars. *American Journal of Plant Sciences*, 10(12): 2354-2365. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.1012163>
- Torres García, S., Puente Isidró, M., De Cupere, F., Gabriel Puerto Aguiar, M., y Rodríguez García, M. 2003. Efecto alelopático del boniato (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)), sobre la germinación y crecimiento de cultivos y malezas (Vol. 30). http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V30-Numero_1/cag141031274.pdf
- Torres, G. A. 2021. Cumarinas como fuente de agentes alelopáticos (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26348>
- Trujillo Sánchez, A.F. 2008. Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre *Lactuca sativa* (Tesis de licenciatura). Universidad Tecnológica de Pereira. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/2380e1b9-cd1e-445e-ba97-61cc13c5cdbf/content>
- Zamorano, Carolina, y Fuentes, Cilia L. 2005. Potencial alelopático de *Brassica campestris* subsp. rapa y *Lolium temulentum* sobre tres especies de malezas de la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana*, 23(2): 261-268. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652005000200010&lng=en&tlng=es

Etapas del protocolo de crioconservación y su efecto sobre la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinífera* L.)

Stages of the cryopreservation protocol and its effect on the viability and regeneration of grapevine zygotic embryos (*Vitis vinífera* L.)

Deanna Esquivel-Figueroa¹, Martín Ernesto Tiznado-Hernández², María Auxiliadora Islas-Osuna², María Fernanda Lazo-Javalera³ y Marisela Rivera-Domínguez^{1*}✉

¹ Coordinación de Ciencia de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria. Hermosillo, Sonora. C.P. 83304. México.

² Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria. Hermosillo, Sonora. C.P. 83304. México.

³ Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. Carretera 100 a Bahía de Kino km. 21.5, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

La vid es uno de los principales cultivos del mundo y el Estado de Sonora es el mayor productor de México. Este cultivo está en constante peligro por diversos factores bióticos y abióticos, de ahí la importancia de su conservación. La crioconservación es idónea para este cultivo, pero puede provocar alteraciones fisiológicas, moleculares y bioquímicas, afectando la viabilidad y la regeneración. Por lo anterior, en este trabajo se planteó analizar el efecto de las etapas del protocolo de crioconservación sobre la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid. La viabilidad del tejido (V) y la regeneración de plántulas (RP), mostraron que la solución 2 de vitrificación de plantas (PVS2) ejerce protección a los embriones (V: 85 %, RP: 60 %), mientras que la exposición combinada a la solución PVS2 y nitrógeno líquido (NL) ocasionó disminución de la viabilidad y regeneración (V: 68 %; RP: 2 %). Un efecto más drástico se observó cuando el tejido fue expuesto a PVS2+NL y recalentamiento (RC) (V: 68 %; RP: 0 %). Sin embargo, la viabilidad y la regeneración se recuperó cuando el tejido se sometió a PVS2+NL+RC y solución de descarga (SD) (V: 92 %; RP: 60 %). Se concluye que la utilización de la solución de descarga es fundamental para disminuir daños a los tejidos debido a las diferentes etapas de crioconservación.

Palabras clave: crioprotector, nitrógeno líquido, vitrificación

ABSTRACT

The grapevine is one of the main crops in the world, and Sonora State is the largest producer in Mexico. This crop is in constant danger due to various biotic and abiotic factors, therefore the importance of its conservation. Cryopreservation is ideal for this culture, but it can cause physiological, molecular, and biochemical alterations, affecting viability and regeneration. Hence, this work analyzed the effect of cryopreservation protocol stages on the viability and regeneration of grapevine zygotic embryos. Tissue viability (V) and plantlets regeneration (RP) showed that plant vitrification solution 2 (PVS2) protects embryos (V: 85 %, RP: 60 %), while

combined exposure to PVS2 solution and liquid nitrogen (LN) caused decreased viability and regeneration (V: 68 %; RP: 2 %). A more drastic effect was observed when the tissue was exposed to PVS2+LN and rewarming (RW) (V: 68 %; RP: 0 %). However, viability and regeneration were recovered when the tissue was subjected to PVS2+LN+RW and unloading solution (US) (V: 92 %; RP: 60 %). It is concluded that the use of the unloading solution is essential to decrease tissue damage due to the different stages of cryopreservation.

Key words: cryoprotectant, liquid nitrogen, vitrification

INTRODUCCIÓN

La crioconservación es una técnica que permite conservar el germoplasma de tejidos y células en nitrógeno líquido (NL) a una temperatura de - 196 °C con el uso de osmo y crioprotectores (González-Arno *et al.*, 2014; Nausch y Buyel, 2021). Entre los crioprotectores se encuentra la solución 2 de vitrificación de plantas (PVS2), la cual está compuesta por: glicerol 30 % (p/v), etilen-glicol 15 % (p/v), dimetilsulfóxido (DMSO) 15 % (p/v) y sacarosa 0.4 M. La PVS2 ha sido descrita como una solución crioprotectora eficiente y es la solución de vitrificación más utilizada para la crioconservación de tejidos vegetales (Sakai *et al.*, 1990; Normah *et al.*, 2019). Los componentes de esta solución interactúan con las moléculas de agua mediante fuerzas dipolo y puentes de hidrógeno, para disminuir la cantidad de moléculas de agua libres y así evitar se forme cristales de hielo extra e intracelular (Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, no optimizar las condiciones durante las distintas etapas de la crioconservación puede inducir alteraciones bioquímicas, fisiológicas y moleculares (Kaity *et al.*, 2008; Rahmah *et al.*, 2015; Zakaria *et al.*, 2020; Quijada-Rivera *et al.*, 2023), influyendo en la viabilidad y regeneración de los tejidos. Esto, es aún controversial, ya que algunos trabajos reportan que la crioconservación es una técnica eficiente, mientras que otros mencionan lo contrario. En este sentido, Martínez-Montero *et al.* (2012) y Souza *et al.* (2016) establecieron un protocolo de crioconservación para puntas de brote de *Ananas comosus* L., que no afectó el ren-

*Autor para correspondencia: Marisela Rivera-Domínguez
 Correo-e: marisela@ciad.mx

Recibido: 10 de marzo de 2023

Aceptado: 23 de octubre de 2023

Publicado: 13 de noviembre de 2023

dimiento en campo de las puntas de brote crio conservadas (Villalobos-Olivera *et al.*, 2019). Bettoni *et al.* (2019) reportaron el 50 - 55 % de regeneración en puntas de brote crioconservadas de *Vitis*. Ganino *et al.* (2012) reportó plasmólisis en puntas de brote del híbrido Kober 5 BB (*Vitis berlandieri* y *Vitis riparia*) debido a la vitrificación. Además, en yemas axilares de vid se encontró que la deshidratación provocó un aumento del malondialdehído y el recalentamiento causó variabilidad genética. Mas aún, la PVS2 y el glicerol provocaron obscurecimiento del tejido (Lazo-Javalera *et al.*, 2015; 2016; 2017). García-Coronado *et al.* (2016) reportaron alteración en los niveles de expresión del ADN metiltransferasas por la vitrificación en embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. De ahí la importancia de evaluar las alteraciones que puede provocar cada etapa del protocolo de crioconservación. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto sobre la viabilidad y regeneración del tejido en respuesta a las distintas etapas del proceso de crioconservación para la optimización del protocolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los embriones cigóticos se extrajeron de semillas de uvas de la variedad Red Globe obtenidas de mercados de abastos de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Las frutas seleccionadas fueron lavadas con agua destilada y con jabón (detergente en polvo), y luego enjugadas con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente, se extrajeron las semillas de las bayas, y se realizó una prueba de viabilidad de semillas mediante flotación en agua destilada, para separar las pseudo-semillas (semillas que flotan) de las semillas llenas (semillas que precipitan) (Ugbede y Hamadina, 2018). Las semillas que precipitaron se desinfectaron con etanol al 70 % (v/v) por 1 min, después con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 7 min, y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. En caso de ser necesario, las semillas se colocaron dentro de medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) hasta por 15 d, para el desarrollo y maduración del embrión. Después, las semillas se trataron con 1000 ppm de ácido giberélico por 24 h a 25 °C, con la excepción del tratamiento control. Al finalizar el tratamiento con ácido giberélico, las semillas fueron diseccionadas con la ayuda del bisturí y el estereoscopio dentro de la campana de flujo laminar (Horizontal Laminar Flow Cabinet, Esco Airstream®) bajo condiciones estériles (Daigger Scientific Inc.) para la extracción de los embriones (1 a 3 mm de longitud), los cuales fueron colocados dentro de crio-viales de 2 mL para realizar los tratamientos del protocolo de la crioconservación.

Crioconservación

La crioconservación se realizó de acuerdo a lo descrito por García-Coronado *et al.* (2016). Los embriones fueron expuestos a PVS2 [30 % (p/v) glicerol, 15 % (p/v) etilenglicol y 15 % (p/v) de dimetilsulfóxido (DMSO)] al 50 % por 10 min a 25 °C y después fueron expuestos a PVS2 al 100 % por 10 min a 4

°C. Posteriormente, se sumergieron en NL (-196 °C) durante 30 min y después fueron recalentados en baño de María a 38 °C por 3 min. Finalmente, se expusieron a solución de descarga (1.2 M sacarosa) durante 7 min a 25°C. Los tratamientos fueron T1: embriones sin tratamiento (control), T2: embriones expuestos a NL, T3: embriones expuestos a PVS2, T4: embriones expuestos a PVS2+NL, T5: embriones expuestos a PVS2+NL+RC y T6: embriones expuestos a PVS2+NL+RC+SD. En cada tratamiento se realizaron 5 réplicas con 5 embriones cada una.

Análisis de viabilidad

La viabilidad se determinó mediante la técnica de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) de acuerdo a García-Coronado *et al.* (2016) y De Souza Grzybowski *et al.* (2012). Los embriones se colocaron en TTC (1 %) dentro de cajas Petri durante 24 h a 30 °C en obscuridad, y posteriormente fueron observados bajo microscopio estereoscopio.

Regeneración

La regeneración de plántulas se realizó colocando los embriones (T1-T6) en medio de regeneración conteniendo macronutrientes, micronutrientes y vitaminas MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado y suplementado con 0.035 mg/L de ácido giberélico, 50 mg/L de mio-inositol, 50 mg/L de hidrolizado de caseína, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, 3 g/L de carbón activado y 0.1 g/L de citrato de hierro (Tiznado Hernández *et al.*, 2015) e incubados a 26 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 15 d.

En la Figura 1 se muestra el esquema representativo de la evaluación de la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid expuestos a las distintas etapas del protocolo de crioconservación.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Se realizó un diseño completamente al azar, donde cada tratamiento (T1-T6) constó de 5 réplicas con 5 embriones cigóticos en cada réplica para cada análisis (viabilidad y regeneración). Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las diferencias entre las medias, con un nivel de significancia del 95 %. Las variables respuesta fueron el porcentaje de viabilidad del análisis con TTC y el porcentaje de plántulas regeneradas, de acuerdo a los diferentes tratamientos (T1-T6). En los casos que mostraron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación de medias mediante el método de Tukey-Kramer. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico NCSS (Statistical Number System, Kaysville UTA, EUA; versión 2021, v21.0.2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viabilidad de los embriones cigóticos se vio afectada en algunos pasos del protocolo de crioconservación. En el análisis de viabilidad con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Figura 2A), se muestra que en el control (T1), en el tratamiento con

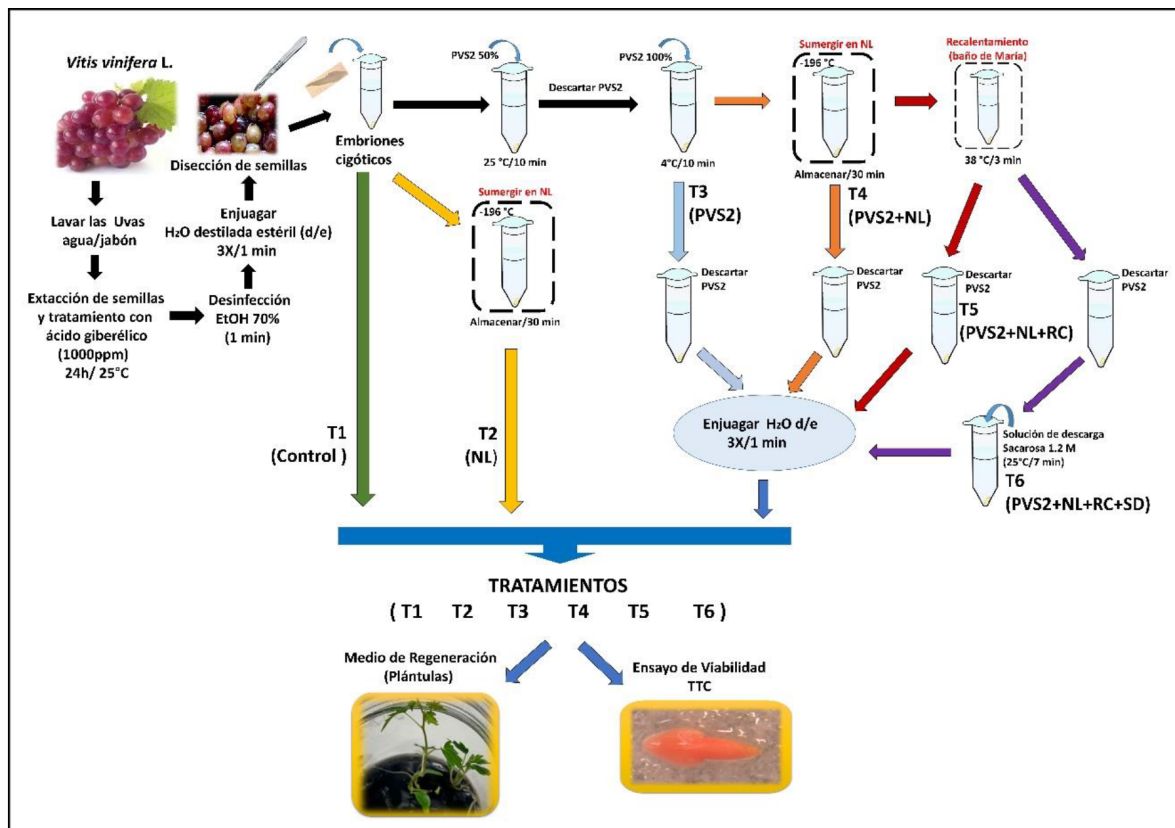


Figura 1. Diagrama representativo de la evaluación de la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid sometidos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD.
Figure 1. Representative diagram of the viability and regeneration assessment of grapevine zygotic embryos subjected to different stages of the cryopreservation protocol. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD.

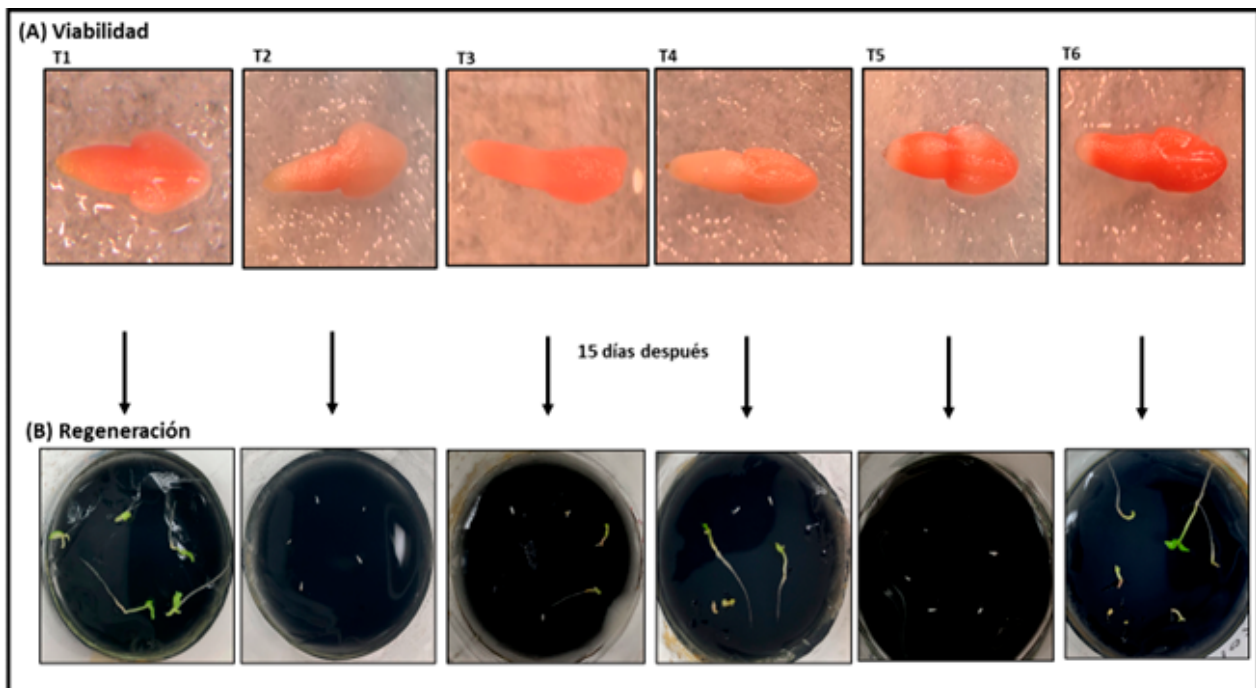


Figura 2. Viabilidad y regeneración *in vitro* de embriones expuestos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. (A) Embriones teñidos con TTC y (B) Plántulas regeneradas a partir de embriones, sometidos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD.
Figure 2. Viability and *in vitro* regeneration of embryos exposed at different stages of the cryopreservation protocol. (A) Embryos stained with TTC and (B) Seedlings regenerated from embryos, subjected to different stages of the cryopreservation protocol. T1: control, T2: NL, T4:PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD.

PVS2 (T3) así como el tratamiento con PVS2+NL+RC+SD (T6) muestran un color rojo por la formación de formazán que indica tejidos viables. Este color es más brillante y uniforme en comparación con los tratamientos NL (T2), PVS2+NL (T4), PVS2+NL+RC (T5). Este comportamiento se vio reflejado en la capacidad de regeneración *in vitro* de los embriones de los tratamientos T1, T3 y T6 después de 15 d en medio de regeneración (Figura 2B). En la Figura 2 se muestra que los embriones que presentaron mayor intensidad del formazán pudieron regenerarse y aquellos con baja intensidad de la coloración fueron los que tuvieron menor porcentaje de regeneración (T2 y T5).

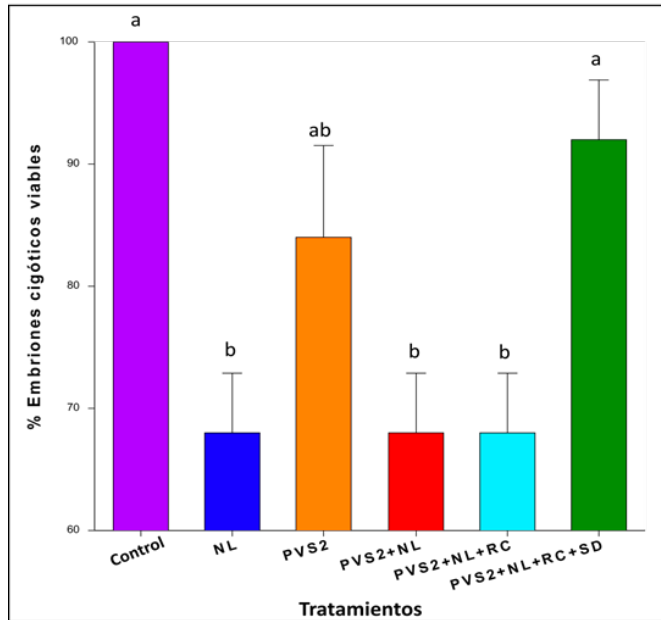


Figura 3. Porcentaje de embriones viables inmediatamente después de cada tratamiento de crioconservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS2+NL+RD+SD. Letras distintas muestran las diferencias significativas entre los tratamientos, $p < 0.05$.

Figure 3. Percentage of viable embryos immediately after each cryopreservation treatment. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD. Different letters show significant differences between treatments, $p < 0.05$.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad (Figura 3) en los embriones de los tratamientos NL y PVS2+NL y PVS2+NL+RC, donde el valor osciló alrededor del 68 %, siendo el porcentaje de viabilidad más bajo en comparación con el control (100 %) y los tratamientos con PVS2 y PVS2+NL+RC+SD. Los embriones expuestos solo a PVS2 mostraron un porcentaje de viabilidad de 84 %, mientras que los expuestos al tratamiento PVS2+NL+RC+SD mostraron un 92 % de viabilidad, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al control (V: 100 %).

La regeneración de plántulas a partir de los embriones expuestos a las distintas etapas del protocolo (tratamientos) de crioconservación se puede observar en la Figura 4, donde se muestra que el control mostró el crecimiento óptimo de plántulas (RP: 100 %), mientras que en el tratamiento con NL el crecimiento fue casi nulo (RP: 4 %), lo cual puede rela-

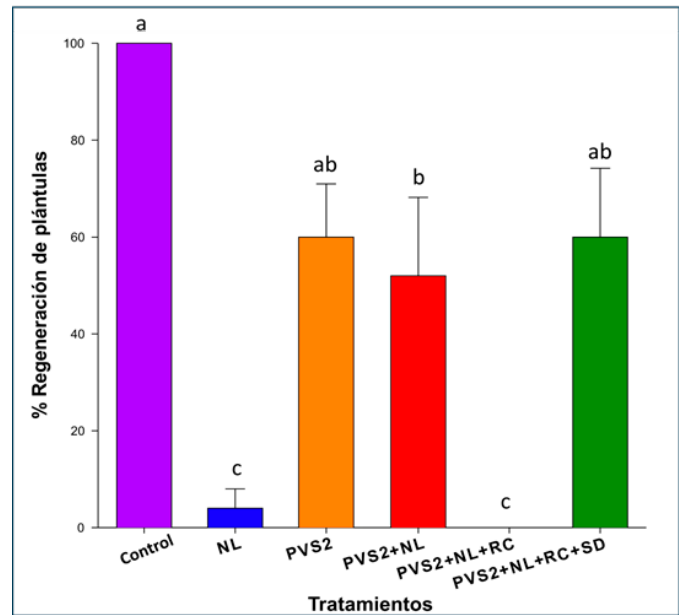


Figura 4. Porcentaje de plántulas regeneradas después 15 días en medio de regeneración. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD. Letras diferentes muestran las diferencias significativas entre los tratamientos, $p < 0.05$.

Figure 4. Percentage of regenerated seedlings after 15 days in regeneration medium. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD. Different letters show significant differences between treatments, $p < 0.05$.

cionarse con la baja intensidad de formazán en el ensayo de viabilidad con TTC (Figura 2A). La regeneración de las plántulas en el tratamiento donde se expone el tejido solamente a PVS2 y en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD fue similar (RP: 60 %), sin diferencias significativas respecto al control. En el tratamiento PVS2+NL, el porcentaje de regeneración disminuyó (RP: 52 %), sin embargo, no fue significativa con respecto al tratamiento PVS2 y al tratamiento PVS2+NL+RC+SD, pero si se encontró diferencia significativa respecto con el control. El crecimiento de las plántulas en el tratamiento PVS2+NL+RC fue nulo, similar al tratamiento con NL. Lo anterior indica que tanto la exposición a NL así como la combinación NL y RC afectan en gran medida el proceso de regeneración de los embriones en estas etapas del protocolo de crioconservación, sin embargo la adición de la SD ayuda a recuperarse del posible daño producido por las etapas anteriores durante el proceso de crioconservación.

El análisis de viabilidad con TTC es implementado para evaluar la viabilidad de semillas (De Souza Grzybowski *et al.*, 2012). Cuando el tejido es viable se desarrolla un compuesto llamado formazán, indicado por un color rojo brillante, debido a la reducción de sales de tetrazolio por la respiración celular en la mitocondria. En cambio, cuando el tejido no es viable no existe la formación de formazán (González-Vera *et al.*, 2019). En este estudio, observamos que la viabilidad de los embriones al utilizar la PVS2 no se vio afectada, pero si por la exposición del tejido a NL y al recalentamiento (PVS2+NL+RC) (Figura 3A). Sin embargo, al utilizar la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD) la viabilidad fue recuperada. Cabe mencionar que los resultados que se obtienen de la

prueba de TTC no son totalmente indicativos de la viabilidad final del tejido, ya que las enzimas encargadas de metabolizar el formazán pueden aún estar activas en células muertas (Nausch y Buyel, 2021), no obstante, este análisis puede ser de gran utilidad como primer acercamiento para discernir entre tejidos con potencial de germinación y regeneración. La prueba de viabilidad más confiable es sin duda la regeneración de los tejidos después del tratamiento (Pinto *et al.*, 2016). Es importante destacar que la prueba de TTC se realizó inmediatamente después de cada uno de los tratamientos, en cambio, la regeneración de los embriones a plántulas se obtiene 15 d después de que el tejido es mantenido en cultivo de tejidos *in vitro* en medio de regeneración, por lo que en este periodo los embriones pudieron tener tiempo para poder recuperarse de alguna alteración debido a los tratamientos de crioconservación.

En el análisis de regeneración de plántulas (Figura 4) los resultados son similares a los que se obtuvieron con el análisis con TTC, donde la viabilidad no se vio afectada de manera significativa con el uso de PVS2, pero si cuando se expone el tejido a NL y al recalentamiento (PVS2+NL+RC). Esto último indica que la exposición a NL y el recalentamiento pueden estar afectando al tejido de manera que generan estrés osmótico por los cambios de temperatura. Además, la viabilidad fue recuperada con el uso de la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD) debido a que los componentes de la solución de descarga ayudaron a disminuir el estrés osmótico que se ocasiona sobre el tejido posterior al recalentamiento (Kaczmarczyk *et al.*, 2012; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020), mejorando la regeneración del tejido. García-Coronado *et al.* (2016) y Lazo-Javalera *et al.* (2018) evaluaron la viabilidad de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe crioconservados mediante la regeneración de plántulas reportando un 30 % y 50 % de regeneración respectivamente. En este estudio se logró obtener 60 % de regeneración al final del protocolo de crioconservación. Datos similares (50 - 55 %) fueron reportados por Bettoni *et al.* (2019) en puntas de brote de *Vitis vinifera* crioconservadas. Varios reportes han sido publicados respecto a la germinación y viabilidad en diferentes tejidos de *Vitis vinifera* incluyendo polen, embriones somáticos, puntas de brotes, yemas, embriones somáticos en suspensión y semillas empleando distintas técnicas de crioconservación (Bi *et al.*, 2017). En ellos los porcentajes de viabilidad y germinación oscilan entre 7 y hasta el 100 % dependiendo del procedimiento de crioconservación y tipo de tejido (Bi *et al.*, 2027). Cabe destacar que, aún no se ha descrito un protocolo de crioconservación óptimo para la conservación de embriones cigóticos de vid. En trabajos previos hemos reportado la crioconservación de embriones cigóticos (García-Coronado, *et al.*, 2016; Quijada-Rivera *et al.*, 2022). En este sentido, el porcentaje de regeneración obtenido en este estudio fue mejorado respecto a nuestros estudios previos. Este es el primer trabajo de *Vitis* donde se analiza cada una de las etapas del protocolo de la crioconservación, con la finalidad de identificar cuál de ellas puede estar ocasionado alguna alteración en los tejidos, que puedan afectar la viabilidad y regeneración

con el fin de optimizar la metodología de crioconservación por tiempo prolongado en embriones cigóticos de vid.

CONCLUSIÓN

Las distintas etapas del protocolo de crioconservación afectaron en grado distinto la viabilidad y la regeneración de los embriones cigóticos de vid, sin embargo, el uso de la solución de descarga es fundamental para disminuir los daños posibles ocasionados a los tejidos debido a las diferentes etapas del protocolo de la crioconservación, mejorando y reestableciendo la regeneración de los tejidos.

REFERENCIAS

- Bettoni, J. C., Bonnart, R., Shepherd, A., Kretschmar, A. y Volk, G. 2019. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) shoot tips from growth chamber-sourced plants and histological observations. *Vitis*. 58, 71-78. doi:10.5073/vitis.2019.58.71-78.
- Bi W. L., Pan Ch., Hao X. Y., Cui Z. H., Kher M. M., Marković Z., Wang Q. Ch. y Teixeira da Silva J. 2017. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) - a review. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* (2017) 53:449-460 DOI 10.1007/s11627-017-9822-9
- Da Silva Cordeiro, L., Collin, M., Callado, C. H., Simões-Gurgel, C., Albarello, N. y Engelmann, F. 2020. Long-term conservation of *Tarenaya rosea* (Cleomaceae) root cultures: histological and histochemical analyses during cryopreservation using the encapsulation-vitrification technique. *Protoplasma*. 257(4), 1021-1033. doi:10.1007/s00709-020-01486-0.
- De Souza Grzybowski, C., De Castro Ohlson, O., Carvalho da Silva, R. y Panobianco, M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Revista Brasileira de Sementes*. 34(1), 47-54. doi:10.1590/S0101-31222012000100006.
- Ganino, T., Silvanini, A., Beghé, D., Benelli, C., Lambardi, M. y Fabbri, A. 2012. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biología Plantarum*. 56(1), 78-82. doi:10.1007/s10535-012-0019-0.
- García-Coronado, H., María-Elena, B.F., Troncoso-Rojas, R., Rivera-Domínguez, M. y Tiznado-Hernández, M. 2016. Cryopreservation by vitrification of *Vitis vinifera* cv. "Red Globe" zygotic embryos and effect on the expression of DNA methyltransferase genes. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. 6. doi:10.17265/2161-6264/2016.06.004.
- González-Arno, M. T., Martínez-Montero, M. E., Cruz-Cruz, C. A. y Engelmann, F. 2014. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity. In M. R. Ahuja y K. G. Ramawat (Eds.), *Biotechnology and Biodiversity* (129-170pp). Cham: Springer International Publishing.
- González Vera, M. J., Zanatta Aumonde, T., Meneghello, G. E., Noguez Martins, A. B., Aquino, Y. y Peña, P. 2019. Protocolo de análisis de viabilidad de semillas de chíca mediante test de tetrazolio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(7), 1481-1489.
- Kaczmarczyk, A., Funnekotter, B., Menon, A., Phang, P., Al-Hanbali, A., Bunn, E. y Mancera, R. 2012. Current issues in plant cryopreservation. In I. I. Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology*, 417-43. Croacia: IntechOpen. doi: 10.5772/32860.

- Kaity, A., Ashmore, S. E., Drew, R. A. y Dulloo, M. E. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports*. 27(9), 1529-1539. doi:10.1007/s00299-008-0558-1.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Hernández-Oñate, M. A., Martínez-Montero, M. y Rivera-Domínguez, M. 2018. Análisis de la pérdida iónica de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservadas. *Biocercos*. 20(3), 17-22. doi:10.18633/biotecnia.v20i3.706.
- Lazo-Javalera, M. F., Astorga-Cienfuegos, K. R., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Oñate-Hernández, M. A., Martínez-Montero, M. E. y Rivera-Domínguez, M. 2017. Effect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. 'Flame Seedless'. *Investigación y Ciencia*. 1665-4412, 25, 36-44.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Oñate-Hernández, M. A. y Rivera-Domínguez, M. 2016. Genetic stability of cryopreserved grapevine (*Vitis vinifera* L.) genome by vitrification method. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. 6, 380-386. doi:10.17265/2161-6264/2016.06.003.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., Rocha-Granados M. C., Martínez-Montero, M. E. y Rivera-Domínguez, M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification. *Data in brief*. 5, 549-555. doi:10.1016/j.dib.2015.10.012.
- Martínez-Montero, M. E., González-Arno, M. T. y Engelmann, F. 2012. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation - Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) Cases. In I. K. Igor (Ed.), *Current Frontiers in Cryopreservation* (Ch. 18, 359-396). Rijeka: IntechOpen. doi: 10.5772/32047.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nausch, H. y Buyel, J. F. 2021. Cryopreservation of plant cell cultures – diverse practices and protocols. *New Biotechnology*. 62, 86-95. doi:10.1016/j.nbt.2021.02.002.
- Normah, M. N., Sulong, N. y Reed, B. M. 2019. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. *Cryobiology*, 87, 1-14.
- Pinto, M. D. S., Paiva, R., Silva, D. P. C. D., Santos, P. A. A., Freitas, R. T. D. y Silva, L. C. 2016. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(4), 380-389.
- Quijada-Rivera, M., Tiznado-Hernández, M. E., Hernández-Oñate, M. A., Vargas-Arispuro, I., Astorga-Cienfuegos, K. R., Lazo-Javalera, M. F. y Rivera-Domínguez, M. 2023. Transcriptome assessment in 'Red Globe' grapevine zygotic embryos during the cooling and warming phase of the cryopreservation procedure. *Cryobiology* 110, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.12.016>.
- Rahmah, S., Ahmad Mubbarakh, S., Soo Ping, K. y Subramaniam, S. 2015. Effects of droplet-vitrification cryopreservation based on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium* shooting star orchid. *The Scientific World Journal*. 961793. doi:10.1155/2015/961793.
- Sakai, A., Kobayashi, S. y Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33.
- Souza, F. V. D., Kaya, E., de Jesus Vieira, L., de Souza, E. H., de Oliveira Amorim, V. B., Skogerboe, D., Matsumoto, T., Alves, A. A. C., da Silva Ledo, C. A. y Jenderek, M. M. 2016. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 124(2), 351-360. doi:10.1007/s11240-015-0899-8.
- Tiznado Hernández M. E., Miranda Jiménez A., Ojeda Contreras A. J., Sánchez Estrada A., Arreola Ortiz H. J. y Martínez Díaz G. 2015. Desarrollo de nuevas variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) sin semilla mediante rescate de embriones. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6 (5), 917-928.
- Ugbede, E. y Hamadina, E. 2018. Dormancy in seeds of hybrid cassava varieties (TMS 98/0505 and TMS 95/0379) prior to hardening of seed Coat. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 8(2), 98-103.
- Villalobos-Olivera, A., Martínez, J., Quintana, N., Zevallos, B. E., Cejas, I., Lorenzo, J. C., González-Olmedo, J. y Martínez-Montero, M. E. 2019. Field performance of micropropagated and cryopreserved shoot tips-derived pineapple plants grown in the field for 14 months. *Acta Physiologia Plantarum*. 41(3), 34. doi:10.1007/s11738-019-2825-x.
- Zakaria, S., Subramaniam, S., Mubbarakh, S. A. y James Antony, J. J. 2020. Effect of encapsulation-dehydration cryopreservation on histological analysis of oncidium golden anniversary orchid PLBs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 596, 012082. doi:10.1088/1755-1315/596/1/012082.

Actividad antimicrobiana y antibiofilm del extracto vegetal *Sambucus canadensis* en bacterias patógenas transmitidas por alimentos

Antimicrobial and antibiofilm activity of extract vegetal *Sambucus canadensis* in food-borne pathogenic bacteria

Guadalupe Velázquez-Vázquez^{1,2} , Elena Ortega Morente³ , Antonio Cobo Molinos^{3,4} , Beatriz Pérez-Armendáriz¹ 

¹ Decanato de Ciencias Biológicas. Facultad de Biotecnología. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. 21 sur 1103 Col. Santiago. 72160. Puebla, México.

² Universidad Tecnológica de Tehuacan Prolongación de la 1 Sur 1101 San Pablo Tepetzingo, 75859 Tehuacán, Puebla, México.

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España.

⁴ Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, España.

RESUMEN

Los alimentos contaminados por patógenos forman biopelículas con una alta resistencia a biocidas, desinfectantes y antibióticos. Los extractos vegetales pueden ser una alternativa potencial para combatirlos. Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un extracto vegetal (*Sambucus canadensis*) utilizado ampliamente en comunidades indígenas de México. El trabajo se realizó con bacterias aisladas de alimentos orgánicos. Las pruebas antimicrobianas mostraron actividad en todas las cepas evaluadas principalmente en *S. aureus* 976, *S. entérica* 915, *E. coli* 47553 (CMI 65.1 y 50 µg/mL) respectivamente. Respecto a la obstrucción en la formación de biopelícula se encontraron resultados significativos menores a 35 % a la concentración más baja 0.01 µg/mL frente a las cepas *S. aureus* CECT 976 y *E. coli* 47553. Respecto a los resultados en la disgregación del biopelícula las bacterias *E. coli* CECT 4757, *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 lograron hasta un 36 % de disgregación en la concentración más baja de 0.01 µg/mL siendo estadísticamente significativo respecto al control ($p < 0.001$). Los resultados indican que el extracto vegetal tiene un alto potencial de actividad antibiofilm frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos y plantean riesgos para la salud de las personas.

Palabras clave: extracto vegetal, disgregación, formación, bacteria, salud.

ABSTRACT

Foodborne pathogens form biofilms with high resistance to biocides, disinfectants, and antibiotics. Plant extracts can be a potential alternative to combat them. This study evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of a plant extract (*Sambucus canadensis*) widely used in indigenous communities in Mexico. The work was carried out with bacteria isolated from organic food. The antimicrobial tests showed activity in all the strains evaluated, mainly in *S. aureus* 976, *S. enterica* 915, and *E. coli* 4753 (MIC 65.1 and 50 µg/mL) respectively. Regarding the obstruction in the formation of

biofilm, significant results of less than 35 % were found at the lowest concentration (0.01 µg/mL) against the *S. aureus* CECT 976 and *E. coli* 4753 strains. Regarding the results in biofilm disintegration, *E. coli* CECT 4757, *S. aureus* CECT 976, and *S. aureus* CECT 4465 achieved up to 36 % disintegration under the lowest concentration of 0.01 µg/mL, being statistically significant with respect to the control $p < 0.0001$. The results indicated that the plant extract has a high potential for antibiofilm activity against bacteria that affect food safety and pose risks to people's health.

Key words: plant extract, disintegration, formation, bacteria, health.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por bacterias que contaminan los alimentos son un problema mundial que ocasiona importantes afectaciones en la salud pública (Mantzourani *et al.*, 2022; Pina *et al.*, 2018; Ritter y Tondo, 2014; WHO, 2017). La inocuidad de los alimentos es afectada por una gran cantidad de microorganismos, los cuales tienen un metabolismo que se adapta para sobrevivir frente a distintos tipos de estresores, uno de sus mecanismos de resistencia es la capacidad para formar biopelículas. En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de las biopelículas principalmente por la gran resistencia que presentan frente a diversos tipos de antibióticos (Alejo *et al.*, 2018; Lahiri *et al.*, 2019; Vasudevan *et al.*, 2014). Alrededor del 90 % de los microorganismos poseen esta característica microbiológica (Ortega-Peña y Cendejas, 2014). Las biopelículas son una densa población de células bacterianas sésiles que se adhieren a la superficie, formando una matriz compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ADN, la cual proporciona estabilidad y nutrientes a las células que se adhieren (Friedman *et al.*, 2015; Kavanaugh y Ribbeck, 2012; Ortega y Hernández, 2018). Estas comunidades bacterianas pueden penetrar rápidamente en una amplia variedad de lugares del entorno, incluido el cuerpo humano. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (NIH) alrededor del 80% de las infecciones

*Autor para correspondencia: Guadalupe Velázquez Vázquez
 Correo-e: ghavg@hotmail.com

Recibido: 22 de julio de 2023

Aceptado: 6 de octubre de 2023

Publicado: 13 de noviembre de 2023

de tejidos blandos y duros en humanos son causadas por biopelículas patógenas. Las biopelículas incrementan la resistencia a muchos biocidas, desinfectantes y antibióticos y su tratamiento generalmente se vuelve ineficaz (Amaral *et al.*, 2015; Ortega-Vidal *et al.*, 2021). Son capaces de desarrollar una tolerancia hasta mil veces mayor que las bacterias que crecen en forma libre (Davies, 2003). En este sentido, una necesidad emergente es desarrollar alternativas eficaces y de menor costo para la prevención y control de biopelículas, tal es el caso de recubrimientos con propiedades biocidas derivados de plata o cobre, y en particular productos derivados de extractos vegetales (Trunk *et al.*, 2018). Diversos estudios han reportado la actividad antimicrobiana de algunas plantas contra distintos patógenos (Al-Dhabi *et al.*, 2015; Elhariry *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2010). Incluyendo actividad en la formación y disgregación de biopelículas contra distintas cepas (Adukwu *et al.*, 2012; Bazargani *et al.*, 2015; Pisoschi *et al.*, 2018; Rudrappa y Bais, 2008). Sin embargo, a pesar del potencial de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos antimicrobianos, un gran número de plantas aún no han sido evaluadas y limitados extractos vegetales se han desarrollado como microbiocidas con actividad antibiopelícula. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula del sauco (*Sambucus canadensis* (L.)). Esta especie ha sido reportada con actividad antimicrobiana, antiviral, antioxidante, quimiopreventiva, los cuales han sido asociadas a los componentes presentes en la especie tales como triterpenos, taninos y diversos tipos de flavonoides (Abdelmigid, 2013; Lee y Finn, 2007; Sidor y Gramza, 2014; Tedesco *et al.*, 2017). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre la actividad antibiopelícula de la especie frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La planta de *Sambucus canadensis* (L.) Bolli. fue colectada en la zona de la Sierra Negra de Puebla, México. El material vegetal fue identificado por medio de técnicas taxonómicas y un espécimen fue depositado en el Herbario del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con el ID: 83771. Para obtener el extracto se utilizaron 500 g de hojas secas, fueron maceradas con 4L de etanol al 96% con doble filtrado. Los extractos se filtraron al vacío con papel Whatman N° 4, el sobrenadante se concentró en un rota vapor Buchi® a presión reducida a 35 ± 15 °C, el extracto etanólico fue evaporado al vacío. Para la identificación cualitativa de los diferentes grupos de metabolitos se realizaron pruebas fitoquímicas: alcaloides prueba de Mayer, Drangendorff y Wagner; para Flavonoides prueba del $H_2SO_4FeCl_3$ y Shinoda; para Saponinas prueba de espuma y Rosenthaler; Cumarinas prueba de Baljet; Triterpenos y/o Esteroles prueba de Lieberman-Bouchard; Taninos prueba de Grignard, cada prueba se realizó por triplicado (Carvajal *et al.*, 2009; Patil y Bhise, 2015). Para obtener información sobre grupos funcionales asociados a los compuestos fitoquímicos presentes en la planta se utilizó el espectro en el infrarrojo región media

con transformada de Fourier (TFIR) en un espectrómetro marca Bruker de 4000 a 600 cm^{-1} con resolución de 4 cm^{-1} , Los análisis se realizaron en el departamento de Centro de Servicios de Alta Tecnología (CESAT-UPAEP).

Actividad antimicrobiana. El extracto vegetal se analizó inicialmente por el método de difusión en agar y posteriormente fue sometido a la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI). La actividad antimicrobiana del extracto se evaluó con 2 colecciones pertenecientes al laboratorio de Microbiología de los alimentos y del medio ambiente de la Universidad de Jaén; la colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la colección de cepas previamente aisladas a partir de alimentos orgánicos con una alta tolerancia a los biocidas y resistencia a los antibióticos (Tabla 1) (Fernández-Fuentes *et al.*, 2012).

Tabla 1. Cepas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana y antibiopelícula pertenecientes a dos tipos de colecciones del Laboratorio de Microbiología de los alimentos.

Table 1. Strains used in antimicrobial and antibiofilm activity tests, belonging to two types of collections of the Food Microbiology Laboratory.

Cepas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
Strains belonging to the Spanish Collection of Type Cultures (CECT) and Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

		CMI µg/mL
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 915	50
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4300	>100
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4395	100
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47553	50
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47557	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 976	65

Cepas resistentes aisladas de alimentos orgánicos, producto de origen y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Resistant strains isolated from organic foods, product of origin and Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

		CMI µg/mL
<i>Bacillus cereus</i>	UJA 27q (papa)	70
<i>Enterococcus faecium</i>	UJA 11c (queso)	>100
<i>Lactobacillus casei</i>	UJA 35h (harina)	100
<i>Enterobacter sp.</i>	UJA 37p (tomate)	>100
<i>Pantoea agglomerans</i>	UJA 29 (lechuga)	100
<i>Klebsiella terrigena</i>	UJA 32j (zanahoria)	>100

Método estándar de difusión en agar. Se realizaron pruebas preliminares de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar estándar para obtener las concentraciones óptimas del extracto vegetal que posteriormente serían utilizadas en las pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI). Las cepas se cultivaron en caldo Mueller-Hinton, la suspensión microbiana ajustada a 1.0×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL se vertió en placas con 15 mL de medio de agar Mueller-Hinton (MHA) y se dispersó con un rastrillo microbiológico. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El vehículo (DMSO a la misma concentración alcanzada en cada dilución seriada de los compuestos ensayados) se utilizó como control negativo

y todas las muestras se analizaron por triplicado. La actividad antimicrobiana se expresó en términos del diámetro promedio de la zona de inhibición en milímetros. Un halo de inhibición ≤ 5 mm se interpretó como ausencia de actividad antimicrobiana.

Prueba de concentración inhibitoria mínima. Los valores de CMI se determinaron mediante el método de microdilución en caldo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015), las diluciones 100 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incubaron con suspensiones microbianas ajustadas a 5×10^5 UFC/mL en TSB. Se incluyeron controles de crecimiento y esterilidad para cada aislado, y el vehículo se incluyó como control negativo. Las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C y las lecturas se realizaron después de 24 h de incubación mediante lectura visual y determinación de la densidad óptica (DO 595 nm) en un lector de microplacas iMark (BioRad, Madrid, España). El valor CMI se definió como la concentración de compuesto más baja que impidió el crecimiento celular después de una incubación.

Ensayo de inhibición de la formación de biopelículas. Se analizó el extracto vegetal diluido en serie en un rango de 100 a 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, según el valor de CMI obtenido previamente, para determinar la capacidad de los compuestos para obstruir la formación de biopelículas y también su potencial para disgregar biopelículas previamente formadas, como lo describen Ulrey *et al.* (2014). La inhibición de la formación de biopelículas inducida por compuestos aislados se midió mediante el método de tinción de violeta cristal descrito por Djordjevic *et al.* (2002). Posteriormente se incubaron suspensiones bacterianas (10^6 UFC en TSB) con concentraciones crecientes del extracto (24 h, 30 °C). Los pocillos con suspensiones bacterianas y medio TSB se ejecutaron en paralelo como controles positivos para la formación de biopelículas. Todos los pozos se lavaron con agua del grifo y las biopelículas se fijaron con metanol. La placa se tiñó con cristal violeta al 0.3 % y se leyó en un iMarkMicroplate Reader (Bio-Rad, Madrid, España) DO 595 nm.

Ensayo de la disgregación de películas formadas previamente. Después de la formación de la biopelícula (24 h, 30 °C) en una placa de microtitulación de 96 pocillos, el contenido se aspiró y los pocillos se lavaron suavemente dos veces con solución salina fisiológica estéril, se añadieron 100 mL del compuesto diluido apropiado, los pozos sin el extracto sirvieron como controles positivos. Después de una incubación de 24 h a 30 °C, se realizó la tinción de violeta cristal descrita anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para analizar los resultados de la significancia estadística de las medias de la absorbancia se utilizó una prueba ANOVA y prueba post hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95 % con Statgraphics Plus versión 8.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE. UU.).

RESULTADOS

Las pruebas fitoquímicas del extracto de *Sambucus canadensis* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides,

saponinas y taninos. Las pruebas del espectro de infrarrojo (TFIR) del extracto vegetal mostró distintas frecuencias de estiramiento y flexión; las frecuencias de estiramiento del enlace O-H en 3350 cm^{-1} es asociado a grupos fenólicos, al estar involucradas en enlaces por puente de hidrógeno, se produce un ensanchamiento de la banda. Las vibraciones de estiramiento del enlace C-H correspondientes a los grupos metilo y metileno aparecen en un rango $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$ y las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones de flexión en 1386 cm^{-1} para el metilo y 716 cm^{-1} para el etilo, las vibraciones de estiramiento del enlace carbonilo, C=O aparecen en un rango $1750\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la presencia de flavonoides. Asimismo, en un rango $1600\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ aparece un doble enlace conjugado C=C de los anillos aromáticos característico de la estructura base de los flavonoides (Figura 1). Respecto a la actividad antimicrobiana el extracto mostro actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco con todas las cepas evaluadas, el mayor diámetro de inhibición fue de 13.5 mm frente *S. aureus* CECT 976, 12.5 mm en *B.cereus* CECT 976 y 12 mm con *E. coli*. Asimismo, la efectividad del extracto en las cepas bacterianas probadas se determinó midiendo la CMI₉₀. Las cepas más susceptibles fueron *S. aureus* CECT 976, *S. enterica* CECT 915, así como *E. coli* 47553 con valores de CMI de, 75 y 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que *Enterobacter sp.* 37p y *E. faecium* 11c fueron las bacterias más resistentes con valores mayores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 1).

Los resultados sobre la inhibición de la formación de biopelículas mostraron que el extracto a las concentraciones de 1.0 y 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió la biopelícula de *S. enterica* CECT 915, *S. enterica* CECT 4395 y *S. enterica* 405 con porcentajes de inhibición de 41, 50 y 47 % respectivamente ($p < 0.05$). Para las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una inhibición en la formación del biofilm del 43 y 41 % respectivamente en las concentraciones más bajas de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambas cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$). La cepa *E. coli* CECT 4753 en la menor concentración 0.01 se redujo hasta

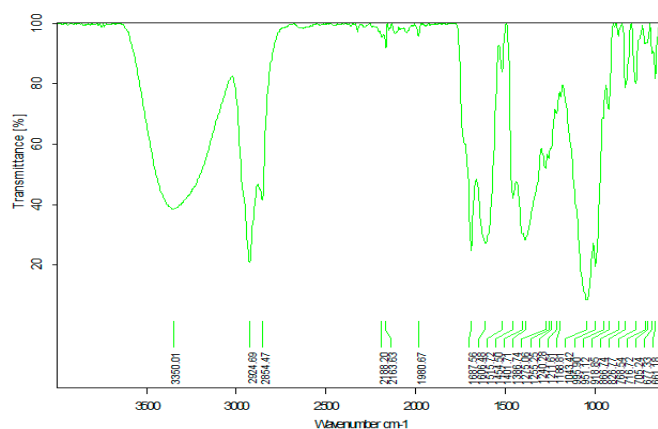


Figura 1. FTIR espectro de *Sambucus canadensis* en el rango de 4000 a 600 cm^{-1} .

Figure 1. FTIR spectrum of *Sambucus canadensis* in the range of 4000 to 600 cm^{-1} .

en un 41% la formación de biofilm siendo estadísticamente diferente respecto al control ($p = 0.001$) Para el caso de *E. coli* 47557 no se lograron resultados de inhibición significativos ($p > 0.05$). Para el caso de las bacterias resistentes aisladas de alimentos ecológicos la cepa *E. faecium* 11c tuvo menor formación de biofilm (60 %) en la concentración más baja 0.01 $\mu\text{g/mL}$ los resultados fueron estadísticamente significativos ($p = 0.05$). La cepa *Pantoea* 29j tuvo el mayor porcentaje de inhibición de formación de biofilm 35 % a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.001$). La bacteria *B. cereus* 277 redujo hasta en 33 y 35 % la formación de biofilm a la concentración de 1.0 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). *L. cassei* 35h redujo hasta en un 27 % la formación de biofilm en las concentraciones más altas con resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Sin embargo, la cepa de *Klebsiella terrigena* 32j en la mayor concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ tuvo un porcentaje de inhibición en la formación de biofilm de hasta 47 % ($p = 0.05$), y menor inhibición en las concentraciones bajas. Respecto a los resultados en la disgregación del biofilm, se puede observar que en algunas bacterias mostraron diferencias significativas en la disrupción de la biopelícula previamente formada (Figura 2). La bacteria *S. enterica* CECT 915 obtuvo porcentajes de disgregación de 34 % ($p < 0.05$) en concentraciones de 0.01

y 0.10 $\mu\text{g/mL}$. Para la cepa *E. coli* CECT 47557 se alcanzó hasta un 36 % de disgregación en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ siendo estadísticamente significativo respecto al control ($p < 0.0001$). Para el caso de las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una disgregación de 30 y 24 % a las concentraciones más bajas de 0.1 y 0.10 $\mu\text{g/mL}$ siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Para el caso de las bacterias resistentes *E. faecium* 11c en las concentraciones intermedias (10 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la disgregación ($p = 0.001$). Por otro lado, la cepa de *Pantoea* 29j disgregó hasta en un 35 % en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. ($p < 0.05$). Similares resultados se pueden observar para *Enterobacter sp.* 37p logrando una disgregación de hasta 35 % en todas las concentraciones evaluadas, incluso las diferencias significativas son más representativas en las concentraciones de 1 a 0.01 ($p < 0.01$). La cepa *B. cereus* 277 también mostró resultados positivos logrando romper la biopelícula hasta en 40% en concentraciones bajas ($p = 0.05$). Por otro lado, con la cepa de *Klebsiella terrigena* 32j y *L. cassei* 35h presentaron la menor disgregación en la concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.001$).

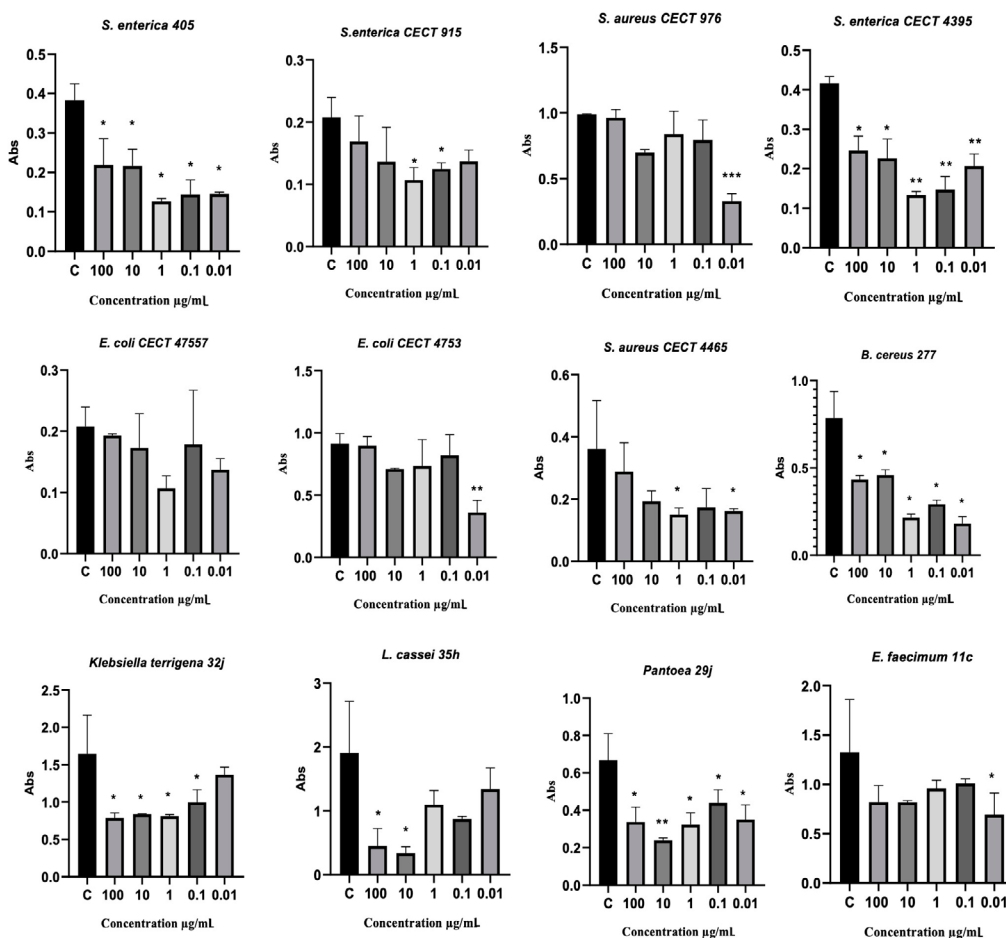


Figura 2. Resultados de la formación de biopelículas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Figure 2. Results of biofilms formation of 12 strains isolated from organic foods. Significant differences with respect to control $p < 0.05$ are shown.

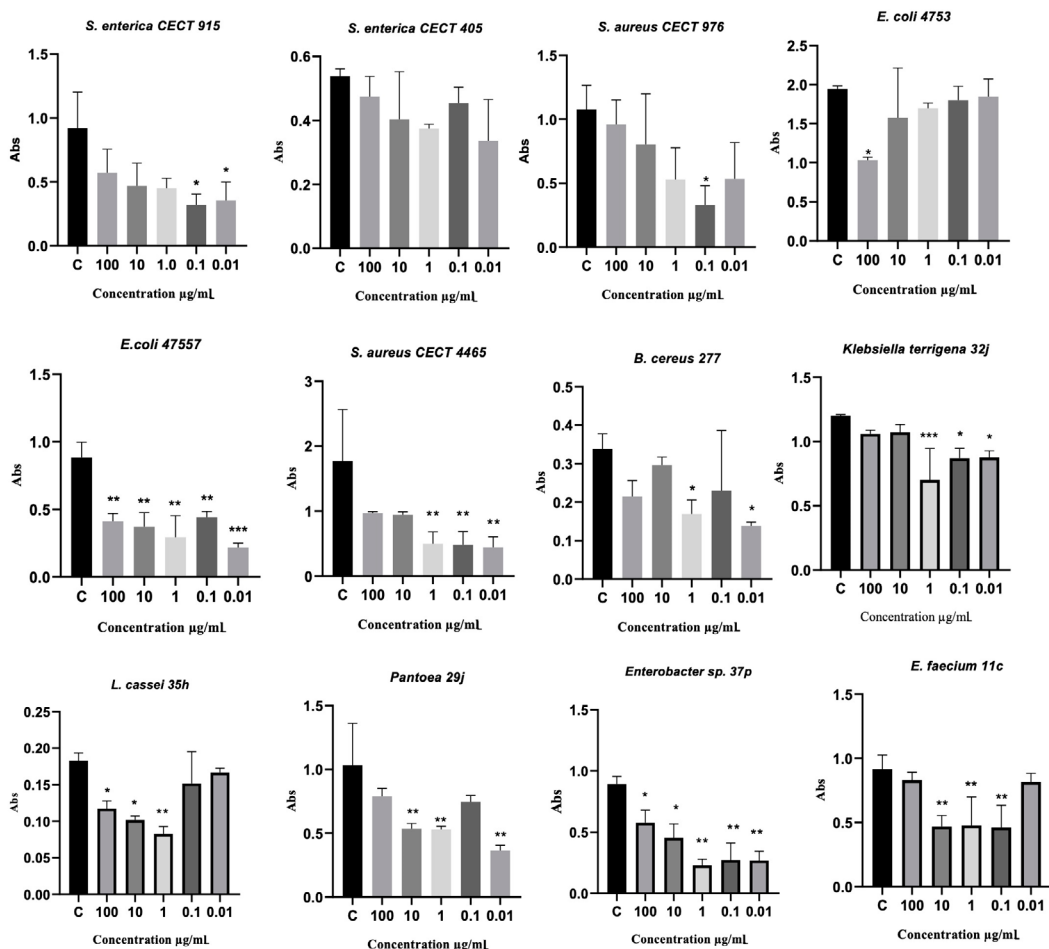


Figura 3. Resultados de la disgregación de biopelículas previamente formadas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Figure 3. Results of previously formed biofilms disintegration from 12 strains isolated from organic food. Significant differences with respect to control $p < 0.05$ are shown.

DISCUSIÓN

La alta resistencia desarrollada por las biopelículas bacterianas a los antibióticos y biocidas varía de un organismo a otro, por lo tanto, su erradicación no es fácil (Caraher *et al.*, 2007). Reducir la capacidad de que las bacterias formen biopelículas es fundamental para poder aplicar un tratamiento más eficaz (Dean *et al.*, 2011; Ulrey *et al.*, 2014). Algunos estudios desarrollados con productos naturales han demostrado que podrían ser eficaces contra las biopelículas bacterianas (Alejo-Armijo *et al.*, 2018; Upadhyay *et al.*, 2013; Vasudevan, 2014). A este respecto Budri *et al.* (2015) reportó una fuerte actividad anti-biopelícula de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*. Cha *et al.* (2005) también mostró que los aceites esenciales de *Artemisia lavandulaefolia*, tienen efectos inhibitorios sobre 15 cepas de bacterias anaerobias entre las que se encuentran *S. aureus*, *Enterobacter* *sp.* entre otras. Yatsuda *et al.* (2005) encontró que los extractos de *Mikania laevigata* y *M. glomerata* inhibían significativamente la adherencia celular de *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*. Asimismo, diversos estudios han reportado actividad antimicrobiana de *Sambucus canadensis*

frente a distintas cepas entre las principales se encuentra *E. coli* y *S. aureus* (Hearst *et al.*, 2010; Holetz *et al.*, 2002) lo cual coincide con lo encontrado en este estudio.

Respecto a los resultados en la formación de biopelículas y la disgregación de películas previamente formadas, se encontró inhibición significativa pues hubo reducción de 30% e incluso en la capacidad de formación de biopelículas dependiendo de la concentración probada. Para el caso de la formación de biofilm de la cepa *S. enterica* CECT 4465, *Klebsiella terrigena* 32j y *L. casei* 35h se presentó una dosis dependiente, induciendo una disminución de 43 a 55% de 47 a 83% y de 23 a 70.4% respectivamente aumentando cuando la concentración incrementó de 0.01 a 100 $\mu\text{g/mL}$. La dosis dependiente encontrado en la formación de *biofilm* ha sido reportada por microorganismos que afectan los alimentos (Alejo-Armijo *et al.*, 2018; Rane *et al.*, 2014). Por otro lado, también se encontraron resultados en los cuales a menor concentración mayor actividad antibiopelícula, en otros estudios también se han reportado efectos paradójicos; menor formación de biofilm en concentraciones más bajas Rane *et al.* (2014) al estudiar el efecto de las proantocianidinas

(PAC) de arándano sobre la formación de biopelículas de *C. albicans* encontró que las dosis altas de PAC de arándano no tuvieron un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la actividad de *C. albicans* pero si las dosis más bajas, también se había observado un efecto paradójico dependiente de la cepa y del fármaco (Melo *et al.*, 2007). Posteriormente, en el experimento de disgregación cuando se permitió que las bacterias se adhieran y formen biopelículas, los mejores resultados se encontraron con las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4465 que indujeron una reducción del 24.8 % y 36 % ($p < 0.05$) a la menor concentración 0.01 $\mu\text{g/mL}$. También se detectó una reducción significativa ($p < 0.05$) del 35.2 % en el *biofilm* preformado con *E. coli* 4757 a la misma concentración. Los resultados encontrados en el estudio pueden asociarse a los compuestos bioactivos de las plantas; por ejemplo, los polifenoles tienden a auto asociarse cuando aumenta la concentración (Pui *et al.*, 2011; Tarakada *et al.*, 2004). También las estructuras externas de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas pueden ser responsables del efecto dosis-dependiente. Los metabolitos secundarios de las plantas tienen diversas propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiano, modulación de enzimas, entre otras (Kurmukov *et al.*, 2013; Skogman *et al.*, 2012). De acuerdo con Rojas *et al.* (2016) algunas plantas poseen alcaloides como los indólicos y los oxidoles a los cuales se les puede asociar la actividad de formación y disgregación debido a que aumentan la actividad fagocítica de neutrófilos, macrófagos, granulocitos como defensa al huésped. Lu *et al.* (2020) indica que compuestos como lactonas y flavonoides presentes en algunas plantas, tienen efectos directos sobre genes y proteínas encargadas de la comunicación celular de las bacterias. En este sentido, el extracto de *Sambucus canadensis* presenta altas cantidades de alcaloides, así como flavonoides, saponinas y terpenos, por tanto, los resultados de este trabajo pueden deberse a estos compuestos los cuales se han reportado que inhiben la formación de biopelículas y dispersan las biopelículas bacterianas. De acuerdo con Dwivedi *et al.* (2016) y Teanpaisan *et al.* (2017) la presencia de alcaloides y flavonoides en extractos vegetales han mostrado una actividad de inhibición de biopelículas. Asimismo, se ha reportado que la sinergia de los compuestos que presentan los extractos crudos podría presentar mejores efectos antimicrobianos y antibiopelícula que los componentes individuales (Mehmood y Murtaza, 2018). Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Adnad *et al.* (2020) mostrando que las plantas pueden emplearse en la industria alimentaria como antibacterianos por el efecto que muestran frente a bacterias patógenas.

CONCLUSIÓN

En este estudio se mostró que el extracto vegetal *Sambucus canadensis* presenta importante actividad antimicrobiana y anti biopelícula frente a bacterias patógenas. Estos resultados se asocian a los componentes de la planta, debido al aumento de la resistencia microbiana a las biopelículas bacterianas, los extractos vegetales ofrecen grandes oportunidades para

desarrollar nuevos productos eficaces e inocuos como una alternativa potencial para combatir bacterias transmitidas en los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento por las facilidades otorgadas para realizar los ensayos en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos y del Medio Ambiente de la Universidad de Jaen, España.

REFERENCIAS

- Abdelmigid, H.M. 2013. New insights into toxicity and drug testing. En: Screening of herbal Medicines for potential toxicities. O. Ifelowua y S. Oluwakanyinsola. (ed.), p 89-121. Sivakumar Joghi Thatha Gowder. Kingdom of Saudi Arabia.
- Adnan, M., Patel, M., Deshpande, S., Alreshidi, M., Siddiqui, A.J., Reddy, M.N., Emira, N., y De Feo, V. 2020. Effect of *Adiantum philippense* extract on biofilm formation, adhesion with its antibacterial activities against foodborne pathogens, and characterization of bioactive metabolites: An in vitro-in silico Approach. *Frontiers in Microbiology*. 11:823-838
- Alejo-Armijo, A., Glibota, N., Frías, M.P., Altarejos, J., Gálvez, A., Salido, S., Ortega-Morente, E. 2018. Synthesis and evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of A-type procyanidin analogues against resistant bacteria in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2151-2158.
- Al-Dhabi ,N.A., Arasu, M.V., y Rejiniemon, T.S. 2015. In vitro antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, and anticancer properties of Isosteviol isolated from endangered medicinal plant *Pittosporum tetraspermum*. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 15:1-11.
- Adukwu, E.C., Allen, S.C.H., y Phillips, C.A. 2012. The antibiofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 113:1217-1227
- Bazargani, M.M., y Rohloff, J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 61:156-164
- Budri, P.E., Silva, N.C., Bonsaglia, E.C.R., Fernandes, A., Araujo, J.P., Doyama, J.T., Goncalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D, y Rall, V.L.M. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of Dairy Science*. 98: 5899-5904
- Caraher, E., Reynolds, G., y Murphy, P. 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 26: 213-221
- Cha, J.D., Jeong, M.R., Choi, H.J., Jeong, S., Moon, S.E., Yun, S., Kim, Y.H., Kil, B.S., y Song, Y.H. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Medica*. 71: 575-577.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Vol. 34. Document M100eS24, No. 3; CLSI: Wayne, PA, 2015.

- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Review Drugs Discovery*. 2: 114-22
- Dean, S.N., Bishop, B.M., y Van Hoek, M.L. 2011. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 11: 114-126.
- Djordjevic D., Wiedmann M., y McLandsborough L.A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2950-2958.
- Dwivedi D., y Singh, V. 2016. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 6: 57-61
- Elhariry, H., Abuzaid, A.A., Khiralla, G.M., y Gherbawy, Y. 2014. Antibiofilm formation and anti-adhesive (to HEp-2 cells) effects of rosemary water extract against some food-related pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 1132-1141
- Fernández-Fuentes M.A., Ortega-Morente E., Abriouel H., Perez R., Galvez A. 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to Biocides and Antibiotics. *Food Control*. 2: 73-78.
- Friedman, M. 2015. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 3805-3822
- Holetz, F., Barbiéri, P., Greisiele, L., Sanches, N., Rogério, C., Diógenes, A., Nakamura, C., Vataru D, y Filho, B. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 1027-1031.
- Hearst, C., McCollum, G., Nelson, D., Ballard, L.M., Millar, B.C., Goldsmith, C.E., y Rao, J.R. 2010. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4: 1805-1809.
- Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., y Gruzewska, A. 2015. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 45: 919-924.
- Kavanaugh, N.L., y Ribbeck, K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4057-4061.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., y Nag., M. 2019. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences*. 44-52.
- Lee J, y Finn C.E. 2007. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 2665-2675
- Lu, H., Tang, S., Yun, G., Li, H., Zhang, Y., Qiao, R., y Li, W. 2020. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. *Biosensors*. 10 (11), p.165.
- Mantzourani, I., Daoutidou, M., Dasenaki, M., Nikolaou, A., Alexopoulos, A., Terpou, A., Thomaidis, N, y Plessas, S. 2022. Plant Extract and Essential Oil Application against Food-Borne Pathogens in Raw Pork Meat. *Foods*. 11:1-13
- Melo, A.S., Colombo, A.L., y Arthington-Skaggs, B.A. 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51: 3081-3088.
- Mehmood, A., y Murtaza, G. 2018. Phenolic contents, antimicrobial and antioxidant activity of *Olea ferruginea* Royle (Oleaceae). *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 18: 173-178.
- Naz, S., Jabeen, S., Llyas, S., Manzoor, F., Aslam, F., y Ali, A. 2010. Antibacterial Activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of Bacteria. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 455-462
- Ortega-Vidal J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Alejo-Armijo, A., Salido, S., y Altarejos, J. 2021. Antimicrobial and antioxidant activities of flavonoids isolated from wood of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.). *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 41:104-117
- Ortega-Peña, S., y Hernández-Zamora, E. 2018. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 75: 79-88.
- Ortega-Peña, F., y Cendejas, R. 2014. Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. *Investigación en Discapacidad*. 3:106-110.
- Rane, H.S., Bernardo, S.M., Howell, A.B., y Lee, S.A. 2014. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence- specific mechanisms. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 69: 428-436.
- Rudrappa, T., y Bais, H.P. 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 1955-1962
- Rojas, J, Velasco, J., Buitrago, A., Mender, T., y Rojas, J. 2016. Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar. *Rev Fac Odontol Univ Nacional*. 58: 2-10.
- Sidor, A., y Gramza-M.A. 2014. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food a review. *Journal of functional foods*. 18:941-958.
- Takarada, K., Kimizuka, R., Takahashi, N., Honma, K., Okuda, K., y Kato, T.A. 2004. Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology Immunology*. 19: 61-64
- Tedesco, M., Kuhn, A.W., Frescura, V.D, Boligon, A.A., Athayde, M.L., Tedesco, S.B., y Silva, A.C. 2017. Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phytochemical screening of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (Adoxaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 89: 2141-2154.
- Pina-Pérez, M.C., y Ferrús-Pérez, M.A. 2018. Antimicrobial potential of legumes extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 72:114-124.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor, H., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., y Son, R. 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. *Review Article. International Food Research Journal*. 18: 465-473.

- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K., y Mathe, E. 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143: 922-935.
- Ritter, A.C, y Tondo, E.C. 2014. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. *Review Article. The journal of infection in Developing Countries*. 8: 254-257.
- Skogman, M.E., Kujala, J., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P.M., y Fallarero, A. 2012. Evaluation of antibacterial and anti-biofilm activities of cinchona alkaloid derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Communications*. 7: 1173-1176.
- Sarkar, R., Chaudhary, S.K., Sharma, A., Yadav, K., Nema, N.K., Sekhoacha, M., y Sen, T. 2014. Anti-biofilm activity of Marula – a study with the standardized bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 154:170-175
- Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., y Puripattanavong, J. 2017. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 7: 172-177.
- Trunk, T., Khalil, H. S., y Leo, J. C. 2018. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*. 4: 140-164.
- Ulrey, R.K., Barksdale, S.M., Zhou, W., Van, y Hoek, M.L. 2014. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 499-511.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 1: 1-16
- Yatsuda, R., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Murata, R.M., Rehder, V.L.G., Melo, L.V., y Koo, H. 2005. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 183-189.
- WHO (World Health Organization). 2016. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Ginebra, Switzerland.



Calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con diferentes formas clínicas de COVID-19, Sonora, México

Health-related quality of life in patients with different clinical forms of COVID-19, Sonora, Mexico

Frida María Huaranga Castro¹, Argelia Trujillo Coronado¹, Gerardo Álvarez Hernández*¹, María del Carmen Candia Plata¹, Luis Fernando López Soto¹, Jesús Adriana Soto Guzmán¹, José Manuel Galván Moroyoqui¹

¹ Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora. Colosio y Reforma S/N, Col. Centro, C.P. 83,000. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN:

Antecedentes. La concurrencia de COVID-19 y padecimientos crónicos no transmisibles son capaces de deteriorar la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) de las personas, pero poco se ha investigado al respecto en México. **Objetivo.** Examinar la CVRS de pacientes recuperados de COVID-19, estratificados por su severidad clínica. **Material y métodos.** Encuesta transversal en 144 adultos mayores de 18 años, con diagnóstico confirmado de infección por SARS-CoV-2 en localidades de Sonora. La CVRS fue examinada mediante el cuestionario SF-36 y comparada de acuerdo con la gravedad de las manifestaciones clínicas. **Resultados.** 131 sujetos se clasificaron con COVID-19 no grave y 13 con un cuadro grave. La media global (76.4 ± 18.4) de la CVRS no fue estadísticamente diferente entre los pacientes agrupados por su severidad clínica; sin embargo, los pacientes con una comorbilidad tuvieron la menor puntuación (72.00 ± 20.74), especialmente los que padecen diabetes mellitus tipo 2 [DM2] (66.33 ± 23.75). También hubo menores puntajes en la función física (58.8 ± 29.6) y el dolor corporal (69.8 ± 20.2). **Conclusiones.** No se observó una diferencia significativa en la CVRS de pacientes de acuerdo con la severidad de las manifestaciones clínicas de COVID-19.

Palabras clave: COVID-19, Calidad de vida relacionada con la salud, severidad, México

ABSTRACT

Introduction. The simultaneity of COVID-19 and chronic non-communicable diseases can impair the health-related quality of life (HRQoL) of individuals, however, limited research has been conducted in Mexico in this regard. **Objective.** Examine the HRQoL of patients recovered from COVID-19, ranked by clinical severity. **Methods.** Cross-sectional survey of 144 adults over 18 years old, with a confirmed diagnosis of infection caused by SARS-CoV-2 in localities in Sonora. HRQoL was examined using the SF-36 questionnaire and compared according to severity of clinical manifestations. **Results.** 131 subjects were classified with non-severe COVID-19 and 13 as a severe case. The overall mean (76.4 ± 18.4) HRQoL was not statistically different between patients grouped by clinical severity; however, patients with a comorbidity had the lowest score (72.00 ± 20.74), especially those with type 2 diabetes (66.33 ± 23.75). There were also lower scores for

physical function (58.8 ± 29.6) and body pain (69.8 ± 20.2). **Conclusions.** There was no significant difference in HRQoL for patients according to the severity of clinical manifestations of COVID-19.

Keywords: COVID-19, health-related quality of life, severity, México.

INTRODUCCIÓN

La pandemia por COVID-19 ha provocado más de 600 millones de casos confirmados y más de 6 millones de muertes. La región de las Américas ha registrado poco más de 181 millones de casos y 2.9 millones de muertes, ubicándose en la segunda y primera posición mundial respectivamente (WHO, 2023). En México, 7 millones de casos confirmados y alrededor de 300 mil muertes fueron notificados. Dentro del país, el estado de Sonora ocupa el noveno lugar en morbilidad nacional con cerca de 200 mil casos y más de 10 mil defunciones (CONACYT, 2023).

La infección por el virus SARS-CoV-2 produce un abanico de manifestaciones, desde asintomáticos hasta alteraciones multisistémicas de efectos agudos, subagudos y crónicos (Nalbandian *et al.*, 2021; Mehta *et al.*, 2020; Davis *et al.*, 2021; Lopez-Leon *et al.*, 2022). Además de las repercusiones físicas, hay expresiones en la esfera mental que pueden prolongarse por varios meses (Groff *et al.*, 2021; Douaud *et al.*, 2022).

La pandemia además de su impacto de salud ha provocado una crisis social y sanitaria que afectan el bienestar humano (Long *et al.*, 2022). En este sentido, se ha demostrado que la concurrencia de COVID-19 y padecimientos crónicos no transmisibles son capaces de deteriorar la calidad de vida de las personas (Crook *et al.*, 2021). Por lo que se ha recomendado que se evalúe sistemáticamente el impacto de una enfermedad sobre las esferas física, social y psicológica. Para esto, se han empleado diversos constructos teóricos e instrumentos de medición, uno de ellos es denominado "calidad de vida relacionada a la salud" (CVRS), entendida como la percepción del efecto que un padecimiento tiene sobre el bienestar individual (Lizán-Tudela, 2009). Uno de los instrumentos válidos para investigar dicho efecto es el cuestionario "Short-Form Health Survey" (SF-36) para examinar ocho aspectos de la salud individual (Ware y Sherbourne., 1992; Ware., 2000; Alonso *et al.*, 1995).

Se acepta que COVID-19 se asocia con el aumento de es-

*Autor para correspondencia: Gerardo Álvarez Hernández
 Correo-e: gerardo.alvarez@unison.mx

Recibido: 24 de junio de 2023

Aceptado: 27 de octubre de 2023

Publicado: 16 de noviembre de 2023

trés individual y colectivo, así como al deterioro físico y emocional (Ceban *et al.*, 2022; Premraj *et al.*, 2022) y sus efectos no se limitan a la gravedad clínica sino al bienestar integral (Lopez-Sampalo *et al.*, 2022). Sin embargo, pocas investigaciones en México han examinado el efecto de COVID-19 en la CVRS; por ello, este estudio examina el impacto de diversas formas clínicas de COVID-19 sobre la CVRS de pacientes recuperados de la enfermedad en el estado de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal en una muestra probabilística de 144 adultos mayores de 18 años, residentes de localidades urbanas de Hermosillo (65), Ciudad Obregón (33), Nogales (14), Navojoa (12), Guaymas (11), Poblado Miguel Alemán (6) y Granados (3) en el estado de Sonora. Los sujetos elegibles tuvieron un diagnóstico confirmado de infección por SARS-CoV-2, mediante una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-TR) o de antígenos, y fueron registrados en la plataforma del Sistema de Vigilancia de la Enfermedad Respiratoria (SISVER), entre septiembre de 2021 y agosto de 2022. Fueron excluidos los sujetos con diagnóstico de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva, falla renal, tuberculosis y VIH/Sida. Los sujetos participaron voluntariamente, y aceptaron el consentimiento informado. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética en investigación del Hospital Infantil del Estado de Sonora (CONBIOETICA26CHB01120131113).

El cuestionario SF-36 (Alonso *et al.*, 1995) fue aplicado por dos encuestadoras, mediante entrevista presencial (16 %) o por llamada telefónica (84 %). Este consta de 36 ítems para examinar ocho dimensiones: función física, rol físico, dolor corporal, salud general, vitalidad, función social, rol emocional y salud mental. Los ítems fueron evaluados de acuerdo con lo recomendado en la literatura (Vilagut *et al.*, 2005).

Se obtuvo información sociodemográfica que fue comparada según la gravedad clínica de los casos, quienes fueron agrupados de acuerdo la guía propuesta por la OMS (2021): el primero fue considerado como COVID-19 no grave y fue compuesto por pacientes con COVID-19 leve sin neumonía vírica ni hipoxia, y por sujetos con neumonía sin signos graves y con saturación arterial de oxígeno (SpO_2) ≥ 90 %; el segundo grupo de pacientes con COVID-19 grave, estuvo conformado por pacientes con neumonía con frecuencia respiratoria > 30 inspiraciones/minuto, dificultad respiratoria grave o $SpO_2 \leq 90$ % y pacientes críticos con síndrome de dificultad respiratoria aguda, septicemia o choque séptico. Adicionalmente, se comparó la frecuencia de síntomas agrupados en tres clústeres: (1) fatiga mental o física; (2) dificultad para respirar y tos, denominado "respiratorio" y (3) problemas cognitivos, emocionales y/o del sueño, identificado como "psicológico" (Hanson *et al.*, 2022). La significancia estadística de las comparaciones se sustentó en pruebas de hipótesis de dos colas y en un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software NCSS®.

RESULTADOS

De los 144 sujetos, 131 (90.1 %) se clasificaron con COVID-19 no grave y 13 (9.0 %) con un cuadro grave. Al comparar la distribución por sexo no se apreció una diferencia significativa ($p = 0.1103$), aunque la mayor proporción (66 %) fueron mujeres. Con respecto a la edad, los pacientes con COVID-19 grave tuvieron un promedio más alto (56.8 ± 11.0), resultando significativo ($p = 0.0262$). Se mantuvieron las diferencias ($p = 0.0480$) al estratificar la edad, mientras ningún adulto joven (18 a 29 años) presentó COVID-19 grave, la mayor proporción (61.8 %) se observó en adultos entre 30 - 59 años. No se observó significancia en el resto de las variables (Tabla 1).

Por otro lado, en las comorbilidades, se apreció que 10 (76.9 %) sujetos del grupo con COVID-19 grave tenían una enfermedad crónica no transmisible (ECNT), esta proporción fue superior a la de los no graves (39.7 %), resultando significativo ($p = 0.0219$). La hipertensión arterial sistémica (HAS) fue la ECNT más frecuente (69.2 %) en sujetos graves, seguida por la DM2 (38.4 %) y obesidad (23.1 %), en tanto a los no graves, el 60.3 % no presentó ninguna comorbilidad, las diferencias fueron significativas ($p = 0.0148$). Al desagregar a los pacientes según el clúster sintomático, se observó que, en el grupo grave, los clústeres respiratorios (46.1 %) y de fatiga

Table 1. Sociodemographic characteristics of study subjects, by clinical presentation.

Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio, según su presentación clínica.

Característica	N (%)			Valor p ^{1/}
	No grave (n=131)	Grave (n=13)	Total (n=144)	
Sexo				
- Mujeres	89 (67.9)	6 (46.2)	95 (66.0)	0.1103
- Hombres	42 (32.1)	7 (53.8)	49 (34.0)	
Edad (continua)	41.8 \pm 14.0	56.8 \pm 11.0	43.2 \pm 4.4	0.0262* &/
Edad (en años)				
- 18 a 29	34 (26.0)	0 (0.0)	34 (23.6)	0.0480*
- 30 a 59	80 (61.1)	9 (69.2)	89 (61.8)	
- 60 y más	17 (12.9)	4 (30.8)	21 (14.6)	
Educación				
- Básica	19 (14.5)	4 (30.8)	23 (16)	0.2460
- Media	36 (27.5)	4 (30.8)	40 (27.8)	
- Superior	76 (58.0)	5 (38.5)	81 (56.3)	
Ingreso familiar mensual^{2/}				
- Bajo (≤ 3 S.M.M.)	23 (17.6)	3 (23.1)	26 (18.1)	0.7190
- Medio ($> 3 - 5$ S.M.M.)	44 (33.6)	3 (23.1)	47 (32.6)	
- Alto (> 5 S.M.M.)	64 (48.9)	7 (53.8)	71 (49.3)	
Grado de marginación social				
- Alto	6 (4.6)	2 (15.4)	8 (5.6)	0.1280
- Medio	9 (6.9)	2 (15.4)	11 (7.6)	
- Bajo	116 (88.5)	9 (69.2)	125 (86.8)	

^{1/} Basado en una prueba de Chi-cuadrada para igualdad de proporciones. &/ Basada en una prueba T de Student

* Estadísticamente significativos al 95 % de confianza

^{2/} S.M.M.=Salarios mínimos en México en el segundo semestre de 2022

(46.1 %) fueron los más frecuentes, mientras en los no graves, el clúster psicológico fue el de mayor proporción (41.2 %), las diferencias fueron significativas ($p = 0.0071$) (Tabla 2).

Con respecto a la CVRS, los pacientes con una comorbilidad tuvieron la menor puntuación (72.00 ± 20.74) y particularmente los que padecen DM2 mostraron una menor puntuación (66.33 ± 23.75) que los pacientes sin esta, una diferencia significativa ($p = 0.0250$). En este sentido, la presencia de clústeres redujo la puntuación de la CVRS cuando se le comparó con su ausencia; el puntaje más bajo (59.88 ± 22.96) ocurrió en el respiratorio (Tabla 3).

Por otro lado, la media global de la CVRS fue de 76.4 ± 18.4 y pese a no apreciar diferencia significativa al estratificar por la gravedad de COVID-19, en la dimensión de función física, si hubo una diferencia significativa ($p < 0.0001$) de 31.8 puntos en detrimento de los sujetos graves, igualmente en el dolor corporal, donde la diferencia fue de 12.4 puntos ($p = 0.0355$), el resto de las dimensiones sin significancia (Tabla 4). Finalmente, encontramos una diferencia significativa ($p = 0.0186$) de 13.04 puntos en la subescala emocional de la CVRS en las mujeres (58.21 ± 21.04) respecto a los hombres (71.25 ± 17.51).

Table 2. Proportional distribution of study subjects, by selected clinical features.

Tabla 2. Distribución proporcional de los sujetos de estudio, según características clínicas seleccionadas.

	N (%)		Valor p ^{1/}
	No grave (n=131)	Grave (n=13)	
Comorbilidades			
- Presente	52 (39.7)	10 (76.9)	0.0219*
- Ausente #	79 (60.3)	3 (23.1)	
Comorbilidades^{8/}			
- Hipertensión arterial	34 (26.0)	9 (69.2)	0.0007*
- Diabetes tipo 2	11 (8.4)	5 (38.4)	
- Obesidad	21 (16.0)	3 (23.1)	
- Otras	8 (6.1)	2 (15.4)	
- Ninguna #	79 (60.3)	3 (23.1)	
Clústeres			
- Presente	69 (52.6)	11 (84.6)	0.0551
- Ausente	62 (47.3)	2 (15.4)	
Clúster^{8/}			
- Fatiga	43 (32.8)	6 (46.1)	0.0071*
- Respiratorio	18 (13.7)	6 (46.1)	
- Psicológico	54 (41.2)	3 (23.1)	
- Ninguno	62 (47.3)	2 (15.4)	

^{1/} Basado en una prueba de Chi-cuadrada para igualdad de proporciones, con corrección de Yates.

^{8/} El porcentaje puede exceder 100 % porque algunos sujetos pudieron reportar más de una comorbilidad o reportar más de un clúster.

* Estadísticamente significativo al 95 % de confianza.

Table 3. Health-related quality of life score in study subjects, by selected characteristics.

Tabla 3. Puntuación de la Calidad de Vida Relacionada con la Salud en los sujetos de estudio, según características seleccionadas.

Característica	CVRS	Valor p ^{8/}
Sexo		
- Mujeres	75.31 ± 19.58	0.1920
- Hombres	78.51 ± 15.84	
Edad categórica		
- 18 a 29	78.05 ± 15.31	0.2027
- 30 a 59	77.34 ± 18.65	
- 60 y más	69.73 ± 21.16	
Forma clínica		
- No grave	77.08 ± 18.09	0.1583
- Grave	69.52 ± 20.80	
Comorbilidades		
- Sin	78.26 ± 16.33	0.0367*
- Una	72.00 ± 20.74	
- Dos o más	77.46 ± 20.64	
Tipo de comorbilidad		
- Hipertensión arterial	71.64 ± 20.46	0.1790
- Sin hipertensión	76.40 ± 18.40	
- Diabetes tipo 2	66.33 ± 23.75	0.0250*
- Sin diabetes	77.66 ± 17.32	
- Obesidad	72.48 ± 20.25	0.2240
- Sin obesidad	77.18 ± 17.99	
Clúster		
- Fatiga	59.88 ± 22.96	< 0.001*
- Sin fatiga	79.53 ± 15.68	
- Respiratorio	60.77 ± 22.96	< 0.001*
- Sin respiratorio	79.56 ± 15.68	
- Psicológico	63.24 ± 20.60	< 0.001*
- Sin	85.09 ± 9.82	

^{8/} Basada en una prueba análisis de varianza de una sola vía.

* Estadísticamente significativos al 95 % de confianza.

Table 4. Health-related quality of life scores of study subjects, according to COVID-19 clinical severity.

Tabla 4. Puntuación de las dimensiones de la Calidad de Vida Relacionada con la Salud, según la condición de gravedad del COVID-19 en los sujetos de estudio.

Dimensiones	N (%)			Valor p ^{1/}
	No grave (n=131)	Grave (n=13)	Total (n=144)	
CVRS	77.0 ± 18.1	69.5 ± 20.8	76.4 ± 18.4	0.2099
- Función física	90.6 ± 18.1	58.8 ± 29.6	87.7 ± 21.3	0.0001*
- Rol físico	83.2 ± 33.6	65.3 ± 47.3	81.6 ± 35.2	0.1830
- Dolor corporal	82.2 ± 21.1	69.8 ± 20.2	81.0 ± 21.3	0.0355*
- Salud en general	64.0 ± 18.5	61.9 ± 17.2	63.8 ± 18.3	0.6667
- Vitalidad	65.8 ± 20.4	59.2 ± 22.3	65.2 ± 20.6	0.3051
- Social	84.1 ± 20.3	84.4 ± 18.2	84.1 ± 20.1	0.9552
- Emocional	74.5 ± 39.8	76.9 ± 39.4	74.7 ± 39.6	0.8342
- Salud mental	72.1 ± 18.8	79.6 ± 14.3	72.8 ± 18.5	0.0806

* Estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95 %.

^{1/} Basado en una prueba T de Student.

DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos documentan que la CVRS es independiente de la severidad clínica de COVID-19, lo que es consistente con reportes previos que tampoco encontraron una asociación significativa entre la severidad y la CVRS de pacientes recuperados (Garrigues *et al.*, 2020; Anastasio *et al.*, 2021; Van den Borst *et al.*, 2021). Si bien, entre 11% y 24% de los pacientes de COVID-19 deterioran su CVRS tras 4 meses de recuperación (Poudel *et al.*, 2021; Sanchez-Ramirez *et al.*, 2021), no es claro en qué medida ni cuáles componentes son los más afectados, debido a factores como la heterogeneidad en los instrumentos para su evaluación, el seguimiento, método diagnóstico y categorización clínica de la COVID-19. Por ejemplo, estudios que emplearon SF-36 en sujetos con COVID-19 solo incluyeron pacientes hospitalizados (Van den Borst *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020) y pocos ambulatorios (Nguyen *et al.*, 2022). Este sesgo de selección puede explicar la supuesta relación entre COVID-19 y la CVRS, entre otras cosas porque no incluye población con COVID-19 leve.

Por otra parte, encontramos que las comorbilidades crónicas en los que sufren COVID-19 reduce su CVRS, semejante a otros reportes que documentan una menor CVRS en pacientes con ECNT (Poudel *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2022) particularmente el exceso de peso que duplica el riesgo de una pobre CVRS en pacientes con COVID-19 (Chen *et al.*, 2020).

De modo semejante a otros estudios (Van den Borst *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), la función física y el dolor corporal fueron las subescalas afectadas significativamente en pacientes graves, probablemente debido a una replicación descontrolada de SARS-CoV-2 que evade la activación inmunitaria innata del huésped, con aumento de respuestas proinflamatorias e infiltración de células inmunitarias provocando daño tisular (Mehandru y Merad, 2022). No obstante, existe evidencia de mayor daño en las subescalas emocional, cognitiva y social, especialmente en pacientes hospitalizados (Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2022).

En cuanto a los clústeres sintomáticos más reportados en pacientes post-COVID-19 (Hanson *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2021) identificamos que en quien se integró algún clúster, especialmente el de fatiga, hubo una reducción de la CVRS. Al igual que estudios previos encontramos un mayor impacto emocional y psicológico en las mujeres (Hanson *et al.*, 2022; Ayuso *et al.*, 2022) lo que puede atribuirse a una mejor percepción de los síntomas, una mayor demanda de asistencia médica y roles sociales diferenciados que las exponen a una carga de estrés familiar (Chen *et al.*, 2020), por lo que deben diseñarse intervenciones para este grupo.

Finalmente, nuestro estudio tiene limitaciones, entre ellas, que el tamaño de la muestra fue pequeño, lo que pudo impedir que se detectaran diferencias significativas entre los grupos. Un sesgo de información pudo surgir al emplear distintos medios para aplicar el cuestionario, y no todos los pacientes tuvieron el mismo tiempo posterior al COVID-19 cuando fueron entrevistados.

CONCLUSIONES

Este estudio no documentó diferencias significativas en la CVRS de pacientes con distinta severidad clínica de COVID-19, lo que es consistente con reportes científicos previos. Es posible que sesgos de selección e información hayan provocado una sobrevaloración del impacto de la enfermedad sobre la CVRS. No obstante, hay esferas particulares de la CVRS como la función física que se deterioran bajo la presencia de comorbilidades crónicas; mientras que la función emocional sufre mayor deterioro en las mujeres.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Alonso J., Prieto L., y Antó J.M. 1995. The Spanish version of the SF-36 Health Survey (the SF-36 health questionnaire): an instrument for measuring clinical results. *Medicina Clinica*. 1995;104(20):771-776. <https://europepmc.org/article/med/7783470>
- Anastasio F., Barbuto S., Scarnecchia E., Cosma P., Fugagnoli A., Rossi G., et al. 2021. Medium-term impact of COVID-19 on pulmonary function, functional capacity, and quality of life. *European Respiratory Journal*. 58(3): 2004015. doi:10.1183/13993003.04015-2020
- Ayuso García B., Pérez López A., Besteiro Balado Y., Romay Lema E., García País M.J., Marchán-López A., et al. 2022. Calidad de vida relacionada con la salud en pacientes recuperados de COVID-19. *Journal of Healthcare Quality Research*. 37(4): 208-125. doi:10.1016/j.jhqr.2022.01.001
- Ceban F., Leber A., Jawad M.Y., Yu M., Lui L.M.W., Subramaniapillai M., et al. 2022. Registered clinical trials investigating treatment of long COVID: a scoping review and recommendations for research. *Infectious Diseases*. 54 (7): 467-477. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2043560>
- Chen K.Y., Li T., Gong F., Zhang J.S., y Li X.K. 2020. Predictors of health-related quality of life and influencing factors for COVID-19 patients, a follow-up at one month. *Frontiers Psychiatry*. 11:668 <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00668>
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. COVID - 19 Tablero México. 2022. Consultado 23 Ene 2023. Disponible en <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>
- Crook H., Raza S., Nowell J., Young M., y Edison P. 2021. Long covid-mechanisms, risk factors, and management. *British Medical Journal*. 374: n1648. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1648>
- Davis H.E., Assaf G.S., McCorkell L., Wei H., Low R.J., Re'em Y., et al. 2021. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *E Clinical Medicine*. 38(101019):101019. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101019>
- Douaud G., Lee S., Alfaro-Almagro F., Arthofer C., Wang C., McCarthy P., et al. 2022. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature*. 604 (7907): 697-707. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04569-5>
- Garrigues E., Janvier P., Kherabi Y., LeBout A., Hamon A., Gouze H., et al. 2020. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. *Journal of Infection*. 81, e4-e6 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.08.29>

- Hanson S.W., Abbafati C., Aerts J.G., Al-Aly Z., Ashbaugh C., Ballouz T., et al. 2022. Estimated global proportions of individuals with persistent fatigue, cognitive, and respiratory symptom clusters following symptomatic COVID-19 in 2020 and 2021. *Journal of the American Medical Association*. 328 (16): 1604-1615. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2022.18931>
- Groff D., Sun A., Sentongo A.E., Ba D.M., Parsons N., Poudel G.R., et al. 2021. Short-term and long-term rates of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *JAMA Network Open*. 4 (10): e2128568. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.28568
- Guo L., Lin J., Ying W., Zheng C., Tao L., Ying B., et al. 2020. Correlation study of short-term mental health in patients discharged after coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection without comorbidities: a prospective study. *Neuropsychiatric Diseases Treatment*. 16: 2661. doi:10.2147/NDT.S278245
- Huang C., Huang L., Wang Y., Li X., Ren L., Gu X., et al. 2021. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet*. 397: 220-232. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32656-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32656-8)
- Liu K., Zhang W., Yang Y., Zhang J., Li Y., y Chen Y. 2020. Respiratory rehabilitation in elderly patients with COVID-19: A randomized controlled study. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 39 (101166):101166 <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101166>
- Lizán-Tudela L. 2009. La calidad de vida relacionada con la salud. *Atención Primaria*. 41 (7): 411-416. doi:10.1016/j.aprim.2008.10.019
- Long E., Patterson S., Maxwell K., Blake C., Bosó-Pérez R., Lewis R., et al. 2022. COVID-19 pandemic and its impact on social relationships and health. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 76 (2): 128-132. <https://doi.org/10.1136/jech-2021-216690>
- Lopez-Leon S., Wegman-Ostrosky T., Perelman C., Sepulveda R., Rebolledo P.A., Cuapio A., et al. 2021. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 11(1):16144 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95565-8>
- López-Sampalo A., Bernal-López M.R., y Gómez-Huelgas R. 2022. Síndrome de COVID-19 persistente. Una revisión narrativa. *Revista Clínica Española*. 222(4):241-250. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2021.10.003>
- Mehandru S., y Merad M. 2022. Pathological sequelae of long-haul COVID. *Nature Immunology*. 23 (2): 194-202. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01104-y>
- Mehta O.P., Bhandari P., Raut A., Kacimi S.E.O., y Huy N.T. 2020. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive review of clinical presentation. *Frontiers in Public Health*. 8:582932 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.582932>
- Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., et al. 2021. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Medicine*. 27(4):601-615. doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z
- Nguyen H.C., Nguyen M.H., Do B.N., Tran C.Q., Nguyen T.T., Pham K.M., et al. 2022. People with suspected COVID-19 symptoms were more likely depressed and had lower health-related quality of life: The potential benefit of health literacy. *Journal of Clinical Medicine*. 9 (4): 965. <https://doi.org/10.3390/jcm9040965>
- Poudel A.N., Zhu S., Cooper N., Roderick P., Alwan N., Tarrant C., et al. 2021. Impact of Covid-19 on health-related quality of life of patients: A structured review. *PLoS One*. 16(10):e0259164. doi:10.1371/journal.pone.0259164
- Premraj L., Kannapadi N., Briggs J., Seal S., Battaglini D., Fanning J., et al. 2022. Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: a meta-analysis. *Journal of Neurological Sciences*. 434(120162):120162
- Sanchez-Ramirez D., Normand K., Yang Z., y Torres R. 2021. Long-Term impact of COVID-19: a systematic Review of the literature and meta-analysis. *Biomedicines*. 9: 900. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080900>
- Van den Borst B., Peters J.B., Brink M., Schoon Y., Bleeker-Rovers C.P., Schers H., et al. 2021. Comprehensive health assessment three months after recovery from acute COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*. 73(5):e1089-98 doi:10.1093/cid/ciaa1750
- Vilagut G., Ferrer M., Rajmil L., Rebollo P., Permanyer-Miralda G., Quintana J.M. et al. 2005. El cuestionario de salud SF-36 español: una década de experiencia y nuevos desarrollos. *Gaceta Sanitaria*. 19 (2): 135-50. <https://scielo.isciii.es/pdf/gsv/v19n2/revision1.pdf>
- Ware J.E., y Sherbourne C.D. 1992. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36) I. Conceptual framework and item selection. *Medical Care*. 30(6): 473-83. <http://www.jstor.org/stable/3765916>
- Ware J.E. 2000. SF-36 Health Survey Update. *Spine*. 25 (24): 31303139. https://journals.lww.com/spinejournal/Citation/2000/12150/SF_36_Health_Survey_Update.8.aspx
- World Health Organization (WHO). 2021. Living guidance for clinical management of COVID-19. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
- World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. 2023. <https://covid19.who.int>

Controlled preparation and chemical actuation of polyacrylonitrile microfibers

Preparación controlada y actuación química de microfibras de poliacrilonitrilo

Josefina Aguila-López¹, Marisel Sánchez-Rivera², José Alfredo Pescador-Rojas³, Maribel Flores-Gonzalez⁴, Joel Díaz-Reyes⁴, José Francisco Sánchez-Ramírez^{4*} 

¹ Instituto Politécnico Nacional-UPIITA, Av. Instituto Politécnico Nacional 2580. Barrio Laguna Tico-mán, 07340. México D. F.

² Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla S/N. La Loma Xicohtécatl, C.P. 90070, Tlaxcala, Tlaxcala.

³ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Escuela Superior de Apan. Carretera Apan-Calpulalpan km. 8, Col. Chimalpa, C.P. 43920 Apan, Hidalgo, México.

⁴ Instituto Politécnico Nacional-CIBA, San Juan Molino Km 1.5 de la Carretera Estatal Sta. Inés Te-cuexcomac-Tepetitla, Tlaxcala, 90700 México.

ABSTRACT

Pure polyacrylonitrile fibers with diameter size at micrometric scale were obtained and collected radially using an immersion-jet wet spinning system. High purity polyacrylonitrile powder was used as precursor polymer. This method is a fast and easy approach to fabricate micrometric PAN fibers. Fiber diameter can be easily controlled by adjusting the size of the spinneret. Uniform, smooth and continuous PAN microfibers were suitable modified by thermal stabilization and alkaline hydrolysis to obtain pH-sensitive fibers. The effect of diameter size fiber on the chemical actuation behavior was investigated in terms of length change characteristics under the influence of pH solutions. The microfibers showed expanding/contracting behavior and force generation stimulated by changes in pH from 1-14. By means of scanning electron microscopy, the formation of PAN fibers with diameters on the micrometer scale of 91-287 μm could be corroborated. FT-IR spectroscopy revealed that the nitrile ($\text{C}\equiv\text{N}$) groups of PAN were converted to carboxylic groups (COOH), which are necessary to provide the deformation of the PAN gel microfibers.

Keywords: Microfabrication; Microfiber; Polyacrylonitrile; Chemical Actuation

RESUMEN

Se obtuvieron fibras puras de poliacrilonitrilo con un diámetro a escala micrométrica y se colectaron radialmente mediante un sistema de hilatura húmeda por inmersión. Como polímero precursor se utilizó polvo de poliacrilonitrilo de alta pureza. Este método es rápido y sencillo para fabricar fibras de PAN micrométricas. El diámetro de la fibra puede controlarse fácilmente ajustando el tamaño de la hilera. Las microfibras de PAN uniformes, lisas y continuas se modificaron adecuadamente mediante estabilización térmica e hidrólisis alcalina para obtener fibras sensibles al pH. Se investigó el efecto del tamaño del diámetro de la fibra en el comportamiento de actuación química en términos de

características de cambio de longitud bajo la influencia del pH de las soluciones. Las microfibras mostraron un comportamiento de expansión/contracción y generación de fuerza estimulado por cambios en el pH de 1-14. Mediante microscopía electrónica de barrido se pudo corroborar la formación de fibras PAN con diámetros en escala micrométrica de 91-287 μm . La espectroscopia FT-IR reveló que los grupos nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$) del PAN se convirtieron en grupos carboxílicos (COOH), los cuales son necesarios para proporcionar la deformación de las microfibras gelificadas de PAN.

Palabras clave: Microfabricación; Microfibra; Poliacrilonitrilo; Actuación química

INTRODUCTION

Recently, much attention has been paid to polyacrylonitrile (PAN) fibers due to their unique properties such as thermal and mechanical stability, good solvent resistance, high degree of molecular orientation, as a precursor for producing carbon fibers by carbonization procedure, chemo-mechanical and electro-chemical performance characteristics (Papkov *et al.*, 2012; Rahaman *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2016; Frank *et al.*, 2012; Shiga and Kurauchi, 1990; Doi *et al.*, 1992; Kalashnik *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2005) and subsequent technological applications as textile, reinforcement fibers, linear actuator and artificial muscles (Shi *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2011; Choe and Kim, 2006; Liu *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). The properties and hence the applicability of these fibers not only depends on their diameter, but also on their chemical purity. Although there are many studies that have demonstrated the special properties and applications of PAN fibers, these have been limited to those commercially available. The commercial PAN fibers have slightly different chemical composition than pure PAN fibers, they are co-polymerized with a small amount of other polymers (such as acrylamide, methyl acrylate, vinyl acetate, methyl methacrylate, and ionic and acidic comonomers like sodium methallyl sulfonate, sodium 2-methyl-2-acrylamido propane

*Author for correspondence: José Francisco Sánchez Ramírez
 e-mail: jfsanchez@ipn.mx

Received: July 31, 2023

Accepted: November 2, 2023

Published: November 16, 2023

sulfonate, sodium *p*-styrene sulfonate, sodium *p*-sulfophenyl methallyl ether, and itaconic acid) for enhancing the solubility, spinnability, hydrophilicity, drawability, thermo-oxidative stabilization and performance characteristic (Samatham *et al.*, 2006; Sedghi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007). However, there is little or no disclosed information about commercially available fibers, making it difficult to study their special properties depending on the chemical composition characteristics. Pure PAN fibers have been little explored so far due to their poor properties and difficulty in handling (Liu *et al.*, 2006) and embrace new challenges for research and technological applications.

Pure PAN fibers have been prepared by an electrospinning technique with diameters in the nano meter scale (Yördem *et al.*, 2008; Sidorina and Druzhinina, 2016), but the limitation of fiber dimensions, the non-uniformity due to fast solvent evaporation and the randomness of the spinning process remain challenging tasks. Wet spinning or dry-jet-wet spinning are alternative methods to prepare PAN fibers, where the spinnerets-extruded PAN is brought into a coagulation bath to precipitate the polymer (Mahmod *et al.*, 2011; Sreekumar *et al.*, 2004). If these techniques are extended to directly fabricate pure PAN fibers in micrometric scale, results in an easy and practical way with predetermined properties, it will greatly simplify the procedure for fabricating long micro-structure and therefore provide new opportunities for other applications such as artificial muscles development.

In this paper, we demonstrate that pure PAN fibers with controlled diameter on the micrometer scale could be conveniently prepared in an easy and versatile way by a single-step approach, using an immersion-jet wet spinning system. We further investigate the effect of diameter on the actuation behavior of pH-sensitive PAN microfibers to evaluate the feasibility of the use as a bio-mimetic linear actuator.

MATERIAL AND METHODS

Materials

In order to ensure the purity of PAN fibers, high purity polyacrylonitrile powder (PAN, average $M_w = 150,000$, purity > 99.5 %), sodium hydroxide (NaOH, reagent grade ≥ 98 %), hydrochloric acid (HCl) and dimethylformamide (DMF, anhydrous 99.8 %) were used, purchased from the Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade water was used at all times to wash the laboratory equipment used in samples preparation.

Immersion-jet wet spinning system

The immersion-jet wet spinning system implemented to prepare pure PAN microfibers consisted of a syringe pump (KD Scientific KDS-100, Holliston, MA, USA), a syringe equipped with a spinneret (single-hole stainless steel tip, hypodermic needle), a glass plate with a coagulation bath (with a length of 10 cm), and a winding drum (3 cm diameter) attached to an electric motor. In the spinning process, the viscous PAN solution was loaded into a plastic syringe attached to a syringe pump, placed in a parallel mount to maintain constant

flow feed inside the coagulation bath. Precursor solution was pumped through spinneret into a water coagulation bath so that the exchange between the polymeric solvent and water takes place until the polymer completely coagulates. The resulting fibers were continuously wound on a winding drum. Figure 1 shows schematically the spinning arrangement used. All the immersion-jet wet spinning parameters were fixed during the spinning process. To evaluate the effect of chemical actuation properties, PAN fibers with different diameters were prepared. Single-hole stainless steel tips (right insert in Figure 1) with different inner diameters 108, 127, 260, 311 and 337 μm (hypodermic needles 33 G, 26 G, 25 G, 24 G and 23 G, were used as spinneret to obtain solid fibers with different diameters at a micrometric scale, denoted as M1, M2, M3, M4 and M5, respectively.

Preparation of PAN fibers

Firstly, the PAN powder was pre-dried at 60 °C for 24 h, then 2.5 g were dissolved in 26.4 mL DMF with stirring at 600 rpm and temperatures in the range of 40 - 50 °C for 24 h. The white dispersed mixture turned into a transparent light-yellow solution after heating with a dynamic viscosity of 1.5167 Pa·s, kinematic viscosity of 1548.6 mm^2/s and density of 0.9794 g/mL (Lee *et al.*, 2007). The precursor PAN-DMF (10 %, w/v) solution was used for spinning all fibers. After the polymer solution was loaded into a 3 mL plastic syringe attached to a syringe pump and subsequently released into a coagulation bath at a fixed extrusion velocity of 0.25 mL/min. After coagulation at about 10 cm in the bath the fibers were continuously collected at the same initial feed speed in radial form using a winding drum. These were best experimental conditions to obtain continuous fibers without the presence of rosary or serpentine type defects. The coagulation temperature was always maintained at 4 °C to improve the mechanical properties of the fibers due to less quantity of micro-pores inside the fibers (Bahrami *et al.*, 2002). After spinning, the polymeric fibers were washed thoroughly in

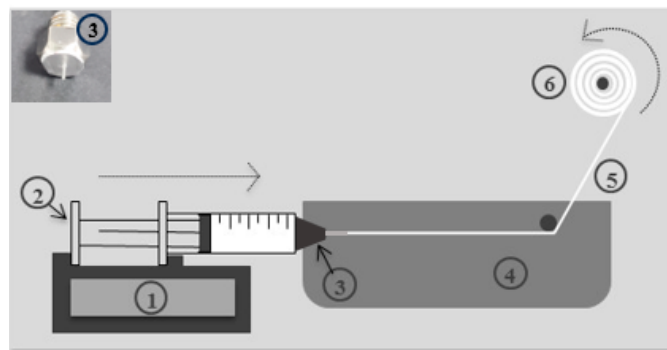


Figure 1. A schematic illustration of the immersion-jet wet spinning system setup used to directly spin PAN fibers: ① syringe pump, ② plastic syringe, ③ spinneret, ④ glass plate with coagulation bath, ⑤ spun fiber, and ⑥ winding drum

Figura 1. Ilustración esquemática de la configuración del sistema de hilatura húmeda por chorro de inmersión utilizado para hilar directamente fibras de PAN: ① bomba de jeringa, ② jeringa de plástico, ③ hilera, ④ placa de vidrio con baño de coagulación, ⑤ fibra hilada y ⑥ tambor de bobinado

distilled water and dried at 80 °C under vacuum for 8 h to remove DMF, leaving white PAN fibers. Finally, the fibers were stored at room temperature for further characterization and chemical activation.

Characterization

A Scanning Electron Microscope (SEM) Vega Tescan, TS-5136SB with 10 kV and x100 was used to obtain microscopy images. An LVSTD secondary electron detector and ESSENCE software were used for SEM analysis. The cross sections of fibers were characterized using the 1600X Digital Microscope. To observe the fiber under SEM, fibers were first dried to ensure liquid removal from the specimen to prevent vaporization during SEM analysis. All fibers were coated with Au to ensure higher conductivity for high-quality imaging. Finally, three images at different locations were taken on the 2 cm long part of fibers for its diameter measurement. Three fiber samples of different diameters were characterized to ensure reproducibility of the results. Effect of chemical activation on the conversion of the nitrile groups to the carboxylic acid groups of PAN fibers were evaluated by Infrared Spectroscopy through a Bruker Vertex 70 brand spectrometer (Bruker Optics Corporation, Billerica USA) with Fourier Transform, in ATR mode. Measurements were made in the mid infrared spectral region (200 – 4000 cm^{-1}), with a resolution of 4 cm^{-1} and an integration time of 60 s (1 s/scan). Data acquisition and processing were performed using OPUS software, version 6.0 (Bruker Optics, USA).

Chemical Activation

In order to prepare activated gel PAN fibers (pH-sensitive) with chemical actuation properties, thermal stabilization and alkaline hydrolysis were carried out (Samatham *et al.*, 2006). The first step was to anneal the fibers at temperatures between its glass transition temperature (above 110 °C) and the thermal degradation temperature (a 240- 300 °C). Three samples of each diameter were used for expanding/contracting application to ensure reproducibility of the results. The first step is expected to change the linear structure of raw PAN fibers in thermally stable cyclized structure containing a large number of cross links ready to withstand high temperature of alkaline hydrolysis process. This chemical structure plays a crucial role in the actuation properties (Houtz, 1950; Ouyang *et al.*, 2008). The process of activation of the PAN fibers is shown in Figure 2.

The second step converts nitrile groups of the stabilized PAN fibers into carboxylic acids by saponification with a strong base, converting the PAN fibers into gel fibers sensitive to a change in pH. Then, the resulting PAN fibers will expand when pK_a (~5) of ionizable groups are higher than the pH of the surrounding medium due to electrostatic repulsion along the chain, and will contract when exposed to an acid medium (Figure 2) (Schreyer *et al.*, 2000). Expansion and contraction behavior are based upon the exchange of counterions and solvent in/out of the gel fibers (Shahinpoor *et al.*, 2002).

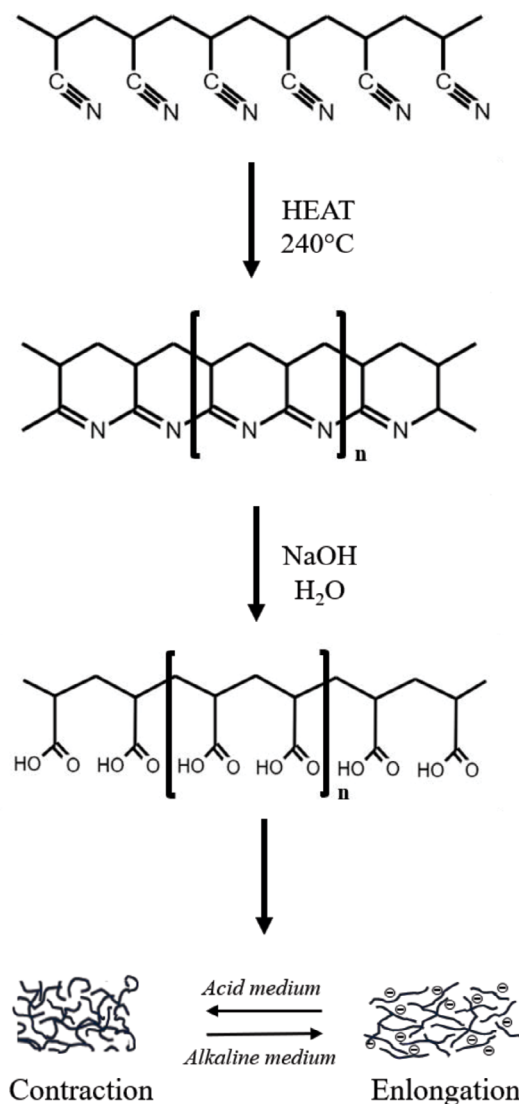


Figure 2. Schematic of reactions occurring during different activation states and contraction/elongation behavior of PAN gel fibers.

Figura 2. Esquema de las reacciones que se producen durante los diferentes estados de activación y el comportamiento de contracción/elongación de las fibras PAN de gel.

For the chemical activation process, PAN fibers were heated at 240 °C in a furnace (Barnstead Thermolyne Furnace 1300) with a heating rate of 2 °C/min in air atmosphere for 2 h. The alkaline hydrolysis process of the fibers was performed in a 1.0 N NaOH boiling solution for 30 min. Subsequently, the hydrolyzed fibers were washed thoroughly in distilled water and dried in an oven at 50 °C for 2 h for future analysis and chemical actuation behavior. PAN gel fibers were expanding/contracting using solutions with pH values from 1 to 14. To vary the pH of the solution HCl and NaOH (1 N) were used.

The force generation characteristics were investigated by preparing single strand PAN fiber in contracted state (Choe and Kim, 2006) using a tensile tester (see Figure 3) and under thermostatic conditions (temperature 25 °C); each fiber was 50 mm in length. One end of the fiber set was care-

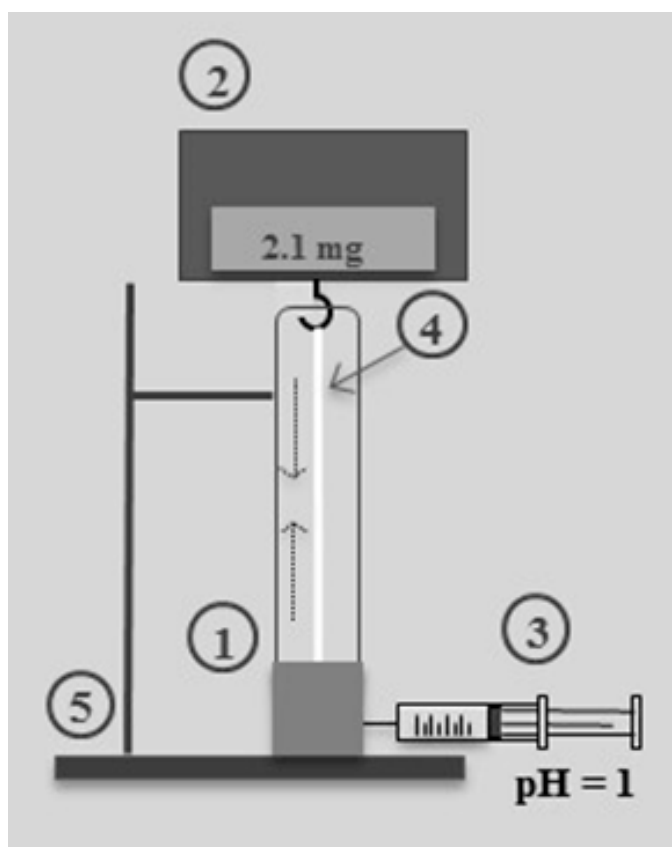


Figure 3. Schematic diagram of the force measurement system of single PAN fiber in contracted state: ① glass plate with solution batch, ② load cell, ③ syringe needle, ④ single PAN microfiber, and ⑤ universal holder.

Figura 3. Diagrama esquemático del sistema de medición de la fuerza de una sola fibra de PAN en estado contraído: ① placa de vidrio con lote de solución, ② celda de carga, ③ aguja de jeringa, ④ microfibras PAN única y ⑤ soporte universal.

fully connected to the load cell (Analytical Balance, Clarkson A S220/C/2) and the other end was fixed to the ground in the solution bath. The force generated in contracted state of the gel fiber, was calculated using the weight value reported by the analytical balance. The HCl solution was poured using a syringe, through a small nozzle to contract the fiber, after which were rinsed with distilled water. The procedure was repeated five times to ensure reproducibility of the results.

RESULTS AND DISCUSSION

As one of the most important goals was to have control over the fiber's diameter, micrographs of the samples were obtained. The effects of the metal tip in the preparation and properties can be clearly observed in Figure 4, which shows SEM of untreated PAN fibers before the stabilization and hydrolysis process. In the left inset image, the radial and continuous collection of the PAN fibers on the drum can be observed, and in the right insert the circular cross section of the fibers is shown. Fibers homogeneous in their length with solid matrix and with circular cross section were obtained using this preparation method. No crack, voids or other types of defects are observable on the fibers. These features are important to mitigate the stress concentration

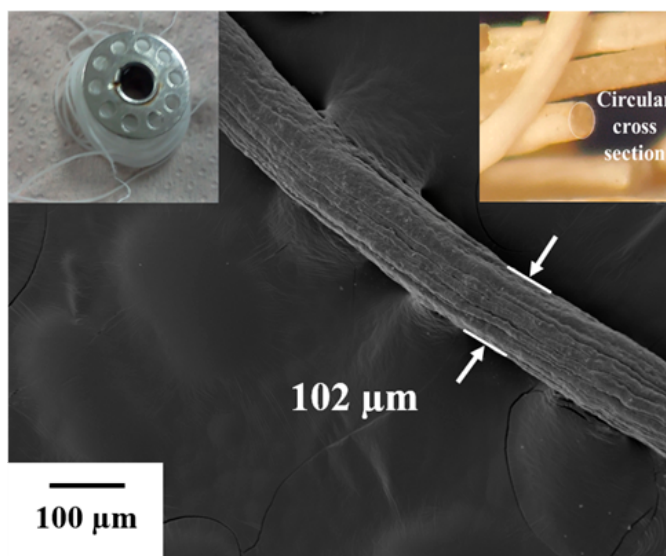


Figure 4. SEM image of raw PAN fibers obtained using the method of immersion-jet wet spinning with spinneret of inner diameter = 127 μm . Left inset: picture of PAN fibers collected radially on winding drum. Right inset: image of cross section of the fiber.

Figura 4. Imagen SEM de fibras PAN crudas obtenidas mediante el método de hilatura húmeda por in-mersión con hilera de diámetro interno = 127 μm . Inserto izquierdo: imagen de las fibras de PAN recogidas radialmente en el tambor de bobinado. Inserto derecho: Imagen de la sección transversal de la fibra.

in the fibers during the thermal stabilization and to improve chemical actuation properties of the resulting PAN fibers in linear actuators and artificial muscles applications (Lee *et al.*, 2007; Schreyer *et al.*, 2000).

To quantify the mean diameter of the PAN fibers, the distribution histogram was performed, for which ~ 150 measurements were carried out. The obtained histograms for each of the samples followed Gaussian fit with narrow size distributions; the average particle size (ϕ_n) obtained were 91, 102, 219, 237 and 287 μm for fibers M1, M2, M3, M4 and M5, respectively. A decrease in stainless steel tip diameter leads to a decrease of average fiber diameter as revealed in the size histograms obtained from the analysis of SEM micrographs of each sample (see Figure 5). It is worth mentioning that the diameter of all samples was approximately 18 % smaller than that of the spinner, due to the reduction of mass loss during diffusion of the solvent out of the precursor solution during gelation. These results demonstrate that stainless steel tip characteristic is transcendental in controlling the diameter in the scale micrometric of PAN fibers.

The preparation of activated fibers is an important step in the production of pH responsive PAN fibers for chemical actuation applications. Figure 6 show the raw, stabilized and hydrolyzed PAN fibers, respectively. On thermal stabilization, the fibers are contracted and their color changed from white to black (Figure 6b). This coloration is attributed to a change from linear structure of raw PAN fibers to cross-linked structures of pyridine ring (Friedlander *et al.*, 1968; Brandrup and Peebles, 1968). On the other hand, as alkali treatment begins the fibers change remarkably in color from black to dark brown, with texture like wet seaweed (Figure 6c), as a result

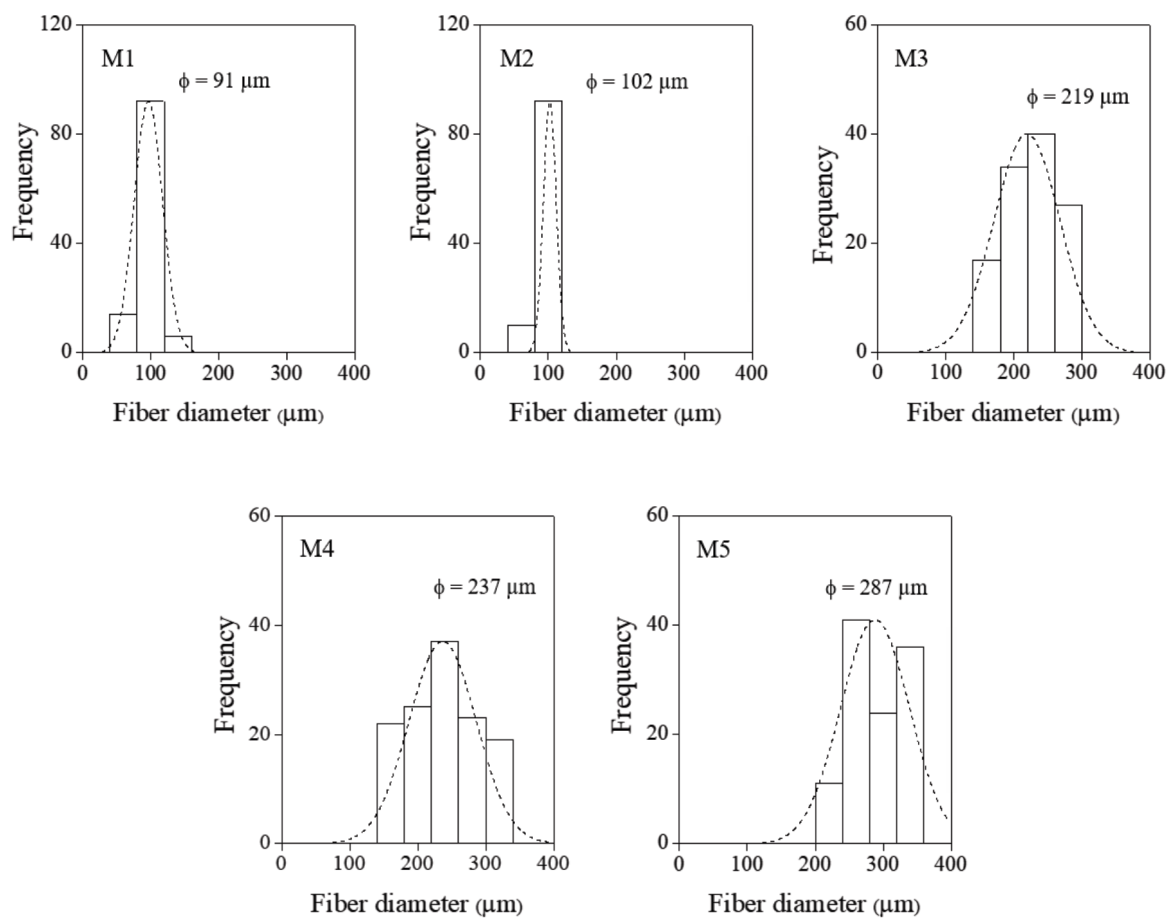


Figure 5. Normalized size distribution of raw PAN microfibers obtained with spinneret of inner diameters: a) 108 μm (M1), b) 127 μm (M2), c) 260 μm (M3), d) 311 μm (M4) and d) 337 μm (M5). Average fiber di-iameter (ϕ) is calculated from Gaussian fitting of the histograms.
Figura 5. Distribución normalizada del tamaño de las microfibras crudas de PAN obtenidas con hilas de diámetros interiores: a) 108 μm (M1), b) 127 μm (M2), c) 260 μm (M3), d) 311 μm (M4) y d) 337 μm (M5). El diámetro medio de las fibras (ϕ) se ha calculado a partir del ajuste gaussiano de los histogramas.

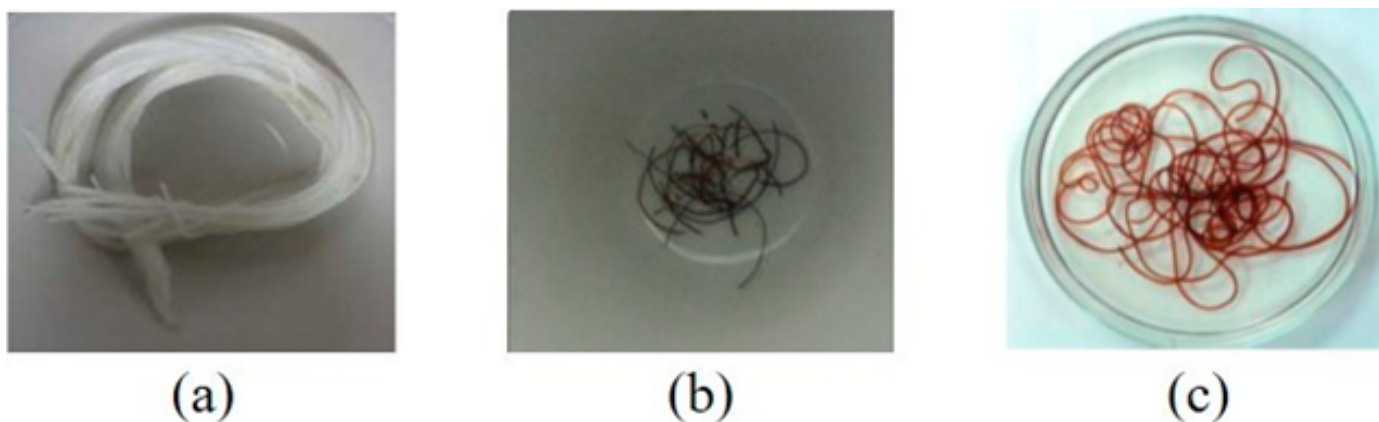


Figure 6. Images of PAN fibers: (a) in raw state, (b) after thermal stabilization process and (c) after alka-line hydrolysis process.
Figura 6. Imágenes de fibras de PAN: (a) en estado crudo, (b) tras proceso de estabilización térmica y (c) tras proceso de hidrólisis alcalina.

of displacement of nitrile groups on annealing to carboxylic acids (Mirbaha *et al.*, 2013).

To verify the chemical composition of the fibers at different activation state, FT-IR spectra were measured. Figure 7 shows the spectra of stabilized and hydrolyzed PAN fibers. The spectrum of raw PAN fiber is presented as reference, in Figure 7a. Typically, PAN fibers spectrum shows the bands in the region of $k\text{ cm}^{-1}$, 2227 - 2257 cm^{-1} , 1472 - 1427 cm^{-1} and 1397 - 1200 cm^{-1} indicating the characteristics of CH, CH₂ and CH₃ group vibrations, stretching vibration of the C≡N group, deformation vibration of CH₂ and other vibrations (Farsani *et al.*, 2009), respectively. The 2948, 1660 and 1354 cm^{-1} peaks correspond to DMF used as solvent. The absence of these peaks in Figure 7c, corroborates the chemical quality of gel fibers. Of particular interest is the C≡N group band. When raw fibers were heated at 240 °C as shown in Figure 7b, a gradual drop in the intensity of 2245 cm^{-1} band of the C≡N group can be observed, with a simultaneously presence of a new band at 1598 cm^{-1} related to C=N, which implies the cyclization of nitrile groups and formation of cross-linked structures in the polymer chain (Lee *et al.*, 2007). The drop in the intensity of the nitrile peak can be used to estimate the extent of stabilization. The spectrum of the heated and then saponified fiber (Figure 7c) exhibit a gradual increase in the intensity of the absorption band at 1731 cm^{-1} , which is attributed to the conversion of the nitrile groups to carboxylic acid groups, which is necessary to provide a large deformation of the PAN microfibers.

Actuation properties of PAN fiber

The actuation properties of the activated PAN microfibers were investigated in terms of length change characteristics under the influence of pH solution ranging from 1 to 14. The measurements are made with sufficient time (5 min) and at ambient temperature. We also investigated the generated force characteristics under the influence of pH = 2.

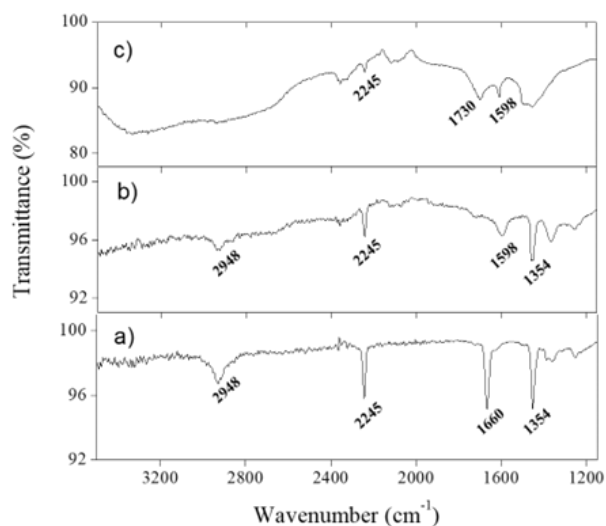


Figure 7. FT-IR spectra of PAN microfibers at different activation states: a) raw fibers, b) stabilized fi-bers and c) stabilized and hydrolyzed fibers.

Figura 7. Espectros FT-IR de microfibras de PAN en diferentes estados de activación: a) fibras crudas, b) fibras estabilizadas y c) fibras estabilizadas e hidrolizadas.

The length change of PAN microfiber with a 287 μm diameter and as function of pH variation (1 to 14) is shown in Figure 8, where the fiber length is plotted against pH. The length change ratio was calculated from Eq. (1):

$$\Delta L = \left(\frac{L_f - L_0}{L_0} \right) (100) \quad (1)$$

where the ΔL , L_f and L_0 are the length change ratio, swelling state length at pH predetermined and original length ($L_0 = 5\text{ cm}$), after two-step activation and washing in distilled water for 30 min. For length change characteristics under the influence of pH solution, the activated PAN fibers were immersed in an initial pH solution of 1. The pH was gradually increased by one pH level (solid square). When the solution reached pH 14, the solution concentration was decreased by one pH = 1 level (solid circle). Length PAN microfibers were monitored for each pH value. Fibers reacted with a length change in function of the pH solution bathing. A negative length change (contraction) was observed ~ 32.8 % for pH = 2 and pH greater than the length change was positive up to a maximum (expansion) of ~ 85.7 % for pH = 8. Increasing the pH (> 8) of the aqueous solution, a progressive decrement was again observed in the fiber length. The same length change was observed between pH 14 and 1 while the pH was decreasing. A hysteresis was noted in the elongation and contraction during all pH values of the aqueous solution, product of the difference in the diffusion rate of the water and ions into and out of the structure of PAN fibers (Schreyer *et al.*, 2000). A similar behavior of the length change characteristics under the influence of pH solution was observed for fiber with other diameters. Also, for smaller diameters the microfibers have a faster response, for example, for microfibers with an average diameter of 91 μm , the length change was completed within 2 s, while for microfibers with an average diameter of 237 μm the response was developed in about 3 s. When fibers were removed from an aqueous environment and allowed to dry, they became rigid with a length close to the original length.

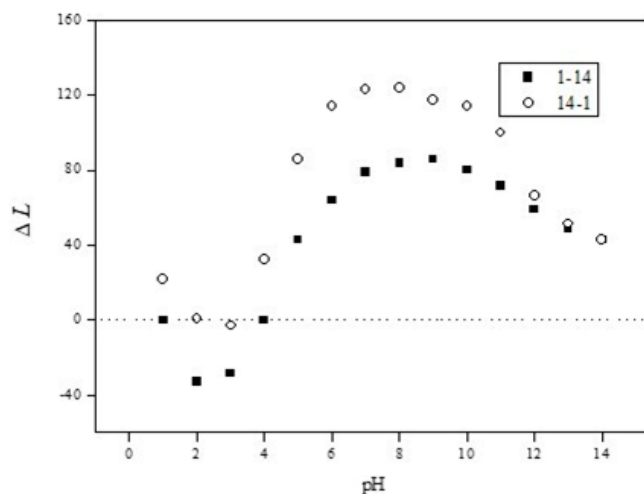


Figure 8. Length variation (ΔL) of PAN gel fibers as a function of pH.

Figura 8. Variación de la longitud (ΔL) de las fibras de gel de PAN en función del pH.

For generative force characteristics, single strand PAN fibers with 5 cm in length and with different diameters were used with a chemically induced method; pH =2 was used for the chemical activation system. The solution was poured through a small nozzle to contract the fiber after which was rinsed with distilled water. Figure 9 shows the profile of contractile force development for the actuation system. The maximum forces generated for each fiber are summarized in the Table 1. The contractile force developed gradual increases as the diameter of fibers increased suggesting that PAN microfibers with greater diameter possess more elastic flexibility. The maximum force is 0.4561 mN for PAN microfiber with a diameter of 287 μm . This value is smaller than that of the commercial PAN microfibers and PAN nanofibers (Choe and Kim, 2006). The discrepancy of generative force between the present and the other fibers may be due to the use of different additives and the diameter of fibers which is two orders of magnitude higher than that of the commercial PAN fibers. Figure 9 also shows that the response time for the maximum force generation in the force measurement system is faster for fibers smaller diameter, for example, for microfibers with a 91 μm average diameter, the force generation was completed within 46 s, while for microfibers with an average diameter of 237 μm the response was developed in about 136 s. For applications as development of biomimetic actuator, the actuation behavior of sensitive pure PAN microfibers should be improved probably adding a small amount known of other polymers. However, it requires further investigations.

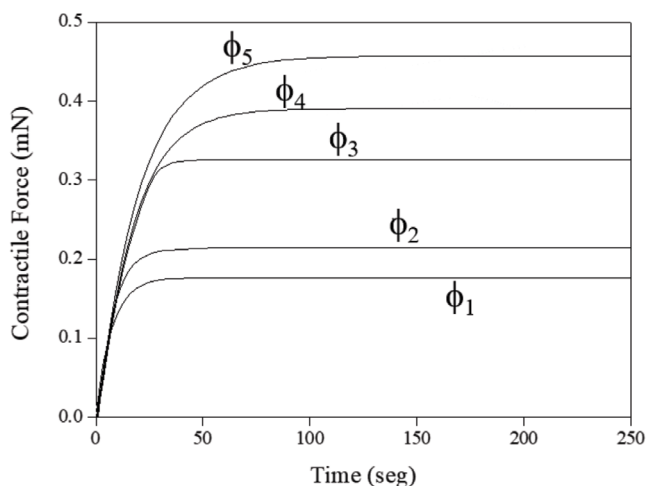


Figure 9. Generative force at pH = 2 of a single PAN fiber with different diameters: $\phi_1 = 91 \mu\text{m}$, $\phi_2 = 102 \mu\text{m}$, $\phi_3 = 219 \mu\text{m}$, $\phi_4 = 237$ and $\phi_5 = 287 \mu\text{m}$

Figura 9. Fuerza generativa a pH = 2 de una sola fibra de PAN con diferentes diámetros: $\phi_1 = 91 \mu\text{m}$, $\phi_2 = 102 \mu\text{m}$, $\phi_3 = 219 \mu\text{m}$, $\phi_4 = 237$ y $\phi_5 = 287 \mu\text{m}$.

Table 1. Maximum generative force of different microfiber diameters.

Tabla 1. Fuerza generativa máxima de diferentes diámetros de microfibras.

Inner diameter of spinneret (μm)	Fiber diameter (μm)	Maximum generative force ($\times 10^{-5}$ mN)
115	91	0.176
125	102	0.215
263	219	0.325
275	237	0.390
344	287	0.456

CONCLUSIONS

We have prepared pure PAN fibers with different diameters in the micrometric scale (91 – 287 μm) using an immersion-jet wet spinning system. The fiber diameter is controlled through variations in the spinner size. Uniform, smooth and continuous PAN microfibers were collected radially and were suitable modified by thermal stabilization and alkaline saponification to obtain fibers responsive to pH levels. The activated PAN microfibers show a maximum contraction of about 32.8 % for pH=2 and a maximum expansion of about 85.7 % for pH = 8. The contractile force increases with a maximum value of 0.4561 mN as the fiber diameter increases, suggesting that PAN microfibers with larger diameter have greater elastic flexibility. The response time for expanding/contracting behavior and for maximum force generation is improved by decreasing the diameter of the gel fibers.

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict of interest.

REFERENCES

- Bahrami, S. H., Bajaj, P. and Sen, K. 2003. Effect of coagulation conditions on properties of poly(acrylonitrile-carboxylic acid) fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 89(7), 1825-1837. doi: 10.1002/app.12275
- Brandrup, J. and Peebles, L. H. 1968. On the chromophore of polyacrylonitrile. IV. thermal oxidation of polyacrylonitrile and other nitrile-containing compounds. *Macromolecules*. 1(1), 64-72.
- Choe, K. and Kim, K. J. 2006. Polyacrylonitrile linear actuators: chemomechanical and electro-chemomechanical properties. *Sensors and Actuators A: Physical*. 126(1), 165-172.
- Doi, M., Matsumoto, M. and Hirose, Y. 1992. Deformation of ionic polymer gels by electric fields. *Macromolecules*. 25(20), 5504-5511.
- Farsani, R. E., Raissi, S., Shokuhfar, A. and Sedghi, A. 2009. FT-IR study of stabilized PAN fibers for fabrication of carbon fibers. *International Journal of Mechanical and Mechatronics Engineering*. 3(2), 161-164.
- Feng, J., Zhang, C., Feng, J., Jiang, Y. and Zhao, N. 2011. Carbon aerogel composites prepared by ambient drying and using oxidized polyacrylonitrile fibers as reinforcements. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 3(12), 4796-4803.
- Frank, E., Hermanutz, F. and Buchmeiser, M. R. 2012. Carbon fibers: precursors, manufacturing, and properties. *Macromolecular Materials and Engineering*. 297(6), 493-501.
- Friedlander, H. N., Peebles, L. H., Brandrup, J. and Kirby, J. R. 1968. On the chromophore of polyacrylonitrile. VI. mechanism of color formation in polyacrylonitrile. *Macromolecules*. 1(1), 79-86.
- Gu, S. Y., Ren, J. and Wu, Q. L. 2005. Preparation and structures of electrospun PAN nanofibers as a precursor of carbon nanofibers. *Synthetic Metals*. 155(1), 157-161.
- Houtz, R. C. 1950. "Orlon" Acrylic Fiber: Chemistry and Properties. *Textile Research Journal*. 20(11), 786-801. doi: 10.1177/004051755002001107

- Kalashnik, A. T., Smirnova, T. N., Chernova, O. P. and Kozlov, V. V. 2010. Properties and structure of polyacrylonitrile fibers. *Polymer Science Series A*. 52(11), 1233-1238.
- Lee, S. J., Lee, D. Y., Song, Y. S. and Cho, N. I. 2007. Chemically driven polyacrylonitrile fibers as a linear actuator. *Solid State Phenomena*. 124-126, 1197-1200.
- Liu, H. C., Chien, A.-T., Newcomb, B. A., Liu, Y. and Kumar, S. 2015. Processing, structure, and properties of lignin- and cnt-incorporated polyacrylonitrile-based carbon fibers. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 3(9), 1943-1954.
- Liu, J.-J., Ge, H. and Wang, C.-G. 2006. Modification of polyacrylonitrile precursors for carbon fiber via copolymerization of acrylonitrile with ammonium itaconate. *Journal of Applied Polymer Science*. 102(3), 2175-2179.
- Mahmod, D. S. A., Ismail, A. F., Mustafa, A., Ng, B. C. and Abdullah, M. S. 2011. Effect of the solvent type on the formation and physical properties of polyacrylonitrile fibers via a solvent-free coagulation bath. *Journal of Applied Polymer Science*. 121(4), 2467-2472.
- Mirbaha, H., Arbab, S., Zeinolebadi, A. and Nourpanah, P. 2013. An investigation on actuation behavior of polyacrylonitrile gel fibers as a function of microstructure and stabilization temperature. *Smart Materials and Structures*. 22(4), 045019.
- Ouyang, Q., Cheng, L., Wang, H. and Li, K. 2008. Mechanism and kinetics of the stabilization reactions of itaconic acid-modified polyacrylonitrile. *Polymer Degradation and Stability*. 93(8), 1415-1421. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.021
- Papkov, D., Beese, A. M., Goponenko, A., Zou, Y., Naraghi, M., Espinosa, H. D., Saha, B., Schatz, G. C., Moravsky, A., Loutfy, R., Nguyen, S. T. and Dzenis, Y. 2012. Extraordinary improvement of the graphitic structure of continuous carbon nanofibers templated with double wall carbon nanotubes. *ACS Nano*. 7(1), 126-142.
- Rahaman, M. S. A., Ismail, A. F. and Mustafa, A. 2007. A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber. *Polymer Degradation and Stability*. 92(8), 1421-1432.
- Samatham, R., Park, I.-S., Kim, K. J., Nam, J.-D., Whisman, N. and Adams, J. 2006. Electrospun nanoscale polyacrylonitrile artificial muscle. *Smart Materials and Structures*. 15(6), N152-N156.
- Schreyer, H. B., Gebhart, N., Kim, K. J. and Shahinpoor, M. 2000. Electrical Activation of Artificial Muscles Containing Polyacrylonitrile Gel Fibers. *Biomacromolecules*. 1(4), 642-647 doi: 10.1021/bm005557l
- Sedghi, A., Farsani, R. E. and Shokuhfar, A. 2008. The effect of commercial polyacrylonitrile fibers characterizations on the produced carbon fibers properties. *Journal of Materials Processing Technology*. 198(1-3), 60-67.
- Shahinpoor, M., Norris, I. D., Kim, K. J., Caligiuri, J., Samatham, R., Choe, K. and Mattis, B. R. 2002. Polyacrylonitrile Nanofibers as Artificial Nanomuscles. En: *Proceedings of the First World Congress on Biomimetics and Artificial Muscle*, 9-11 December 2002, Albuquerque, New Mexico, USA.
- Shi, X.-L., Hu, Q., Wang, F., Zhang, W. and Duan, P. 2016. Application of the polyacrylonitrile fiber as a novel support for polymer-supported copper catalysts in terminal alkyne homocoupling reactions. *Journal of Catalysis*. 337, 233-239.
- Shi, X.-L., Tao, M., Lin, H. and Zhang, W. 2014. Application of the polyacrylonitrile fiber as a support for the green heterogeneous base catalyst and supported phase-transfer catalyst. *RSC Adv*. 4(109), 64347-64353.
- Shiga, T. and Kurauchi, T. 1990. Deformation of polyelectrolyte gels under the influence of electric field. *Journal of Applied Polymer Science*. 39(1112), 2305-2320.
- Sidorina, A. I. and Druzhinina, T. V. 2016. Macrostructure of polyacrylonitrile nanofibers produced by electrospinning. *Fibre Chemistry*. 47(5), 362-366.
- Sreekumar, T. V., Liu, T., Min, B. G., Guo, H., Kumar, S., Hauge, R. H. and Smalley, R. E. 2004. Polyacrylonitrile single-walled carbon nanotube composite fibers. *Advanced Materials*. 16(1), 58-61.
- Wang, P. H., Liu, J. and Li, R. Y. 1994. Physical modification of polyacrylonitrile precursor fiber: its effect on mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*. 52(12), 1667-1674.
- Wu, H.-l., Bremner, D. H., Li, H.-y., Shi, Q.-q., Wu, J.-z., Xiao, R.-q. and Zhu, L.-M. 2016. A novel multifunctional biomedical material based on polyacrylonitrile: preparation and characterization. *Materials Science and Engineering: C*. 62, 702-709.
- Yördem, O. S., Papila, M. and Menceloğlu, Y. Z. 2008. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: an investigation by response surface methodology. *Materials & Design*. 29(1), 34-44.
- Zhao, R., Wang, Y., Li, X., Sun, B., Li, Y., Ji, H., Qiu, J. and Wang, C. 2016. Surface activated hydrothermal carbon-coated electrospun PAN fiber membrane with enhanced adsorption properties for herbicide. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 4(5), 2584-2592.

Efecto de biofertilizantes líquidos, obtenidos a partir de halófitas, en la germinación y emergencia de cuatro especies de hortalizas (*Daucus carota* L., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L. y *Cucumis sativus* L.)

Effect of liquid biofertilizers, obtained from halophytes, on the germination and emergence of four species of vegetables (*Daucus carota* L., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L. y *Cucumis sativus* L.)

Luis Ángel Alcalán-López¹✉, Marcos Alfonso Lastiri-Hernández²✉, Dioselina Álvarez-Bernal^{1*}✉

¹ Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR unidad Michoacán, Justo Sierra 28, Centro, 59510, Jiquilpan, Michoacán, México.

² Tecnológico Nacional de México Campus Los Reyes, Los Reyes 60330, México.

RESUMEN

La fitodesalinización usando especies halófitas permite recuperar suelos salinos, ya que las halófitas son capaces de absorber las sales del suelo y retenerlas en su biomasa. Lamentablemente, al término de su implementación queda mucha biomasa y no se puede simplemente desechar, de ahí que, la producción de fertilizantes orgánicos se presente como una alternativa de solución. El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de germinación y emergencia de cuatro especies de hortalizas en condiciones *in vitro*, al ser expuestas a diferentes biofertilizantes líquidos (BFL) producidos a partir de halófitas. El estudio constó de 76 tratamientos, obtenidos de la combinación de seis BFL, cuatro hortalizas (semillas), tres concentraciones de BFL (5, 10 y 20 %), y un tratamiento control para cada hortaliza. En todas las especies evaluadas hubo reducciones significativas ($p \leq 0.05$) en el crecimiento relativo de radícula (CRR), índice de germinación (IG) y longitud de las plántulas (LT), conforme aumentaba la concentración de biofertilizante líquido; por tanto, concentraciones de BFL superiores al 10% disminuyen considerablemente la germinación y emergencia de las especies evaluadas (IG < 80 %). Sin embargo, dosis bajas de BFL (entre 5 y 10 %) no representan un riesgo (IG > 80 %).

Palabras clave: Biofertilizante líquido, suelo salino, índice de germinación.

ABSTRACT

Phytodesalination using halophyte species allows the recovery of saline soils, since halophytes are capable of absorbing salts from the soil and retaining them in their biomass. Unfortunately, at the end of its use, as waste, there remains a lot of biomass that cannot simply be discarded, which is why the production of organic fertilizers is presented as an alternative solution. The objective of the study was to evaluate the germination and emergence capacity of four vegetable species under *in vitro* conditions, when exposed to different liquid biofertilizers (BFL) produced from halophytes. The study consisted of 76 treatments, obtained from the combination of six BFL, four vegetables (seeds), three BFL concentrations (5, 10 and 20 %), and a control treatment for each vegetable. In all

the species evaluated there were significant reductions ($p \leq 0.05$) in the relative growth of the radicle (CRR), germination rate (IG) and length of the seedlings (LT), as the BFL concentration increased; therefore, BFL concentrations greater than 10 % considerably decrease the germination and emergence of the species evaluated (IG < 80%). However, low doses of BFL (between 5 and 10%) do not represent a risk (IG > 80%).

Keywords: Liquid biofertilizer, saline soil, germination index.

INTRODUCCIÓN

Las halófitas, están dotadas de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que les permiten germinar, sobrevivir y desarrollarse en condiciones salinas (Terrazas-Rueda, 2019). Entre sus mecanismos de adaptación se encuentra el ajuste osmótico por osmolitos, el desarrollo de succulencia, la captación selectiva y el transporte de iones, la respuesta antioxidante y la regulación redox (Nikalje *et al.*, 2018; Lastiri-Hernández *et al.*, 2019). Por lo cual, muchas halófitas tienen la capacidad de extraer sodio (Na^+) del medio en que se encuentren, translocándolo a la parte radicular, aérea o cosechable de la planta, por lo que pueden utilizarse como acompañante de diversos cultivos glicofíticos, principalmente en entornos donde la calidad del agua de riego y/o suelo no sean aptas para fines agrícolas (Lastiri-Hernández *et al.*, 2020).

Estudios realizados por Lastiri-Hernández *et al.* (2021) señalan la efectividad de las halófitas en la reducción de los niveles de salinidad en los suelos, porque con especies como *S. verrucosum* y *T. portulacastrum* es posible bioacumular hasta 186 y 140 kg de Na^+ / hectárea, con una densidad de 22 743 plantas. Sin embargo, la biomasa residual de las halófitas representa una problemática, ya que, debido a su contenido en sales es inviable desecharla o reincorporarla al suelo. Por lo cual, se buscan alternativas para aprovecharla. En este sentido, la producción de abonos orgánicos representa una alternativa; contribuyendo a cerrar el ciclo de la fitodesalinización con halófitas, de manera sustentable. Hasta ahora, solo se ha explorado la producción de compost y vermicompost (Lastiri-Hernández *et al.*, 2023). Sin embargo, también es posible aprovechar la biomasa en la producción de biofertilizantes líquidos (BFL) (Samaniego, 2022).

*Autor para correspondencia: Dioselina Álvarez-Bernal
 Correo-e: dalvarezb@ipn.mx

Recibido: 11 de agosto de 2023

Aceptado: 15 de noviembre de 2023

Publicado: 08 de diciembre de 2023

Los BFL, se obtienen en biodigestores mediante el proceso de digestión anaerobia (DA) (Barampouti *et al.*, 2020), y son un material relativamente estable, con la capacidad de aportar macro y micronutrientes a las plantas (Hernández-Chontal *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2022), así como vitaminas y aminoácidos esenciales; incluyendo factores promotores del crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético (IAA), giberelinas (GA) y microorganismos benéficos (Ladan *et al.*, 2020; Larney y Angers, 2012). Según de-Oliveira-Neto *et al.* (2017) y Bitew y Alemayehu (2017), la eficiencia de los BFL está sujeta a factores, como la calidad de los insumos, su método de preparación, el tiempo de la DA, el estado fenológico y los microorganismos endógenos de las plantas, la dosis, frecuencia y formas de aplicación (fertilización y/o aspersión foliar).

Es importante notar que cuando las halófitas son sometidas a un proceso de DA, existe la posibilidad de que el Na⁺ inmerso en sus tejidos disminuya, pues es probable que, dentro del biodigestor, la mayor parte de las sales se precipiten y se sedimenten al fondo (Kaur *et al.*, 2020). Pese a lo anterior, sigue existiendo el riesgo de que al aplicar las halófitas en forma de BFL, este se convierta en una amenaza para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Majeed y Muhammad, 2019), debido a que la mayoría de los cultivos son sensibles a la salinidad en todas sus etapas fenológicas (Acosta-Motos *et al.*, 2017). Sin embargo, la germinación en especies vegetales es la etapa más crítica, dado que, el estrés salino reduce la absorción de agua durante la imbibición y la turgencia de la semilla (Balkaya *et al.*, 2016; Tarchoun *et al.*, 2022), lo cual se traduce en una reducción en el porcentaje de germinación y en la inhibición de la elongación de los tejidos tanto de la raíz como del hipocótilo (Zhang *et al.*, 2010). Tales respuestas al estrés salino están sujetas tanto a la especie como a los cultivares; por lo que se ha reportado gran variabilidad al respecto (Kandil *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de germinación y emergencia de cuatro especies de hortalizas, entre ellas zanahoria (*Daucus carota* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) en condiciones *in vitro*, al ser expuestas a diferentes biofertilizantes líquidos (BFL) producidos a partir de halófitas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En octubre de 2021, durante la época de estiaje, se colectaron 60 plantas de cinco diferentes especies halófitas (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst; *Distichlis spicata* L.; *Heliotropium curassavicum* L.; *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr y *Sesuvium verrucosum* Raf.), de un área geotérmica conocida como "Los Negritos", perteneciente al municipio de Villamar, Michoacán, México. El lugar se encuentra a 1540 m.s.n.m, en las coordenadas 20° 01' 49.7885" N y -102° 38' 37.8240" W. El tipo de vegetación en la zona es herbácea, sumada de una gran variedad de especies halófitas. La zona es utilizada para pas-

toreo de bovinos y caprinos debido a que una gran parte de sus pastizales es rico en sodio (Lastiri-Hernández *et al.*, 2020).

Durante el proceso de recolección, a las halófitas se les midió su peso fresco con una báscula de la marca Ohaus Compass™ CX y su altura con un flexómetro de la marca Truper®. Las plantas colectadas de *B. monnieri* tenían un peso fresco promedio (FWp) de 106.18 ± 2.41 g y una altura promedio (hp) de 15.42 ± 1.91 cm. Las plantas de *D. spicata* tenían un FWp de 101.92 ± 5.76 g y una hp de 58.66 ± 5.47 cm. Las plantas de *H. curassavicum* tenían un FWp de 109.71 ± 3.29 g y una hp de 26.54 ± 2.65 cm. Las plantas de *F. trinervia* tenían un FWp de 135.44 ± 6.27 g y una hp de 61.15 ± 5.83 cm. Mientras que las plantas de *S. verrucosum* tenían un FWp de 114.61 ± 3.89 g y una hp de 34.25 ± 3.44 cm.

Las halófitas recolectadas fueron llevadas al laboratorio y al terreno experimental del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán (CIIDIR-IPN, Michoacán). En el laboratorio, el material fue separado e identificado por códigos taxonómicos (McVaugh, 1984; Rzedowski y Rzedowski, 1985; Beetle *et al.*, 1987; Espinosa-García y Sarukhán, 1997) y fue comparado con los especímenes del herbario del CIIDIR-IPN, unidad Michoacán. Las especies se clasificaron por familia, especie, estatus migratorio (nativa, exótica o endémica), ciclo de vida y uso antropogénico (Tabla 1).

Proceso de fitodesalinización

Las halófitas colectadas fueron trasplantadas en bolsas de poliestireno negras que contenían 10 kg de suelo; las bolsas no se perforaron para evitar la lixiviación de las sales. El suelo utilizado tuvo las siguientes características: Vertisol de textura arcillosa (arcilla 61 %, limo 16 %, arena 23 %); conductividad eléctrica (CE) de 8.72 ± 0.21 dS m⁻¹; pH de 7.72 ± 0.05; relación de absorción de sodio (SAR) de 28.92 ± 0.82 (mmol_c L⁻¹)^{1/2}; porcentaje de sodio intercambiable (ESP) de 25.12 ± 1.04; porcentaje de materia orgánica (OM) de 4.32% ± 0.04; densidad aparente (Da) de 1.2 ± 0.05; capacidad de retención de agua (WHC) de 132 % ± 1.4; nitrógeno total de 0.2 % ± 0.03; fósforo disponible de 26.42 ± 0.95 mg kg⁻¹; carbonatos de 0.85 ± 0.07 mmol_c L⁻¹; bicarbonatos de 3.56 ± 0.15 mmol_c L⁻¹; cloruros de 21.37 ± 0.93 mmol_c L⁻¹ y sulfatos de 126.81 ± 2.25 mmol_c L⁻¹.

Las halófitas se sometieron a un proceso de fitodesalinización por un periodo de 180 días. Durante este tiempo, las halófitas se regaron cada tercer día con agua del grifo de forma manual para mantener la capacidad de retención de agua al 70 % (1.15 L/ día).

Las características químicas del agua del grifo fueron las siguientes: CE de 300 μS cm⁻¹, pH de 7.68, Ca²⁺ de 0.42 mmol L⁻¹, Mg²⁺ de 3.57 mmol L⁻¹, Na⁺ de 2.75 mmol L⁻¹, K⁺ de 0.34 mmol L⁻¹, Cl⁻ de 4.23 mmol L⁻¹, CO₃⁻² de 1.16 mmol L⁻¹, HCO₃⁻² de 3.58 mmol L⁻¹, SO₄⁻² de 2.47 mmol L⁻¹, carbonatos de sodio residuales (RSC) de 0.75 mmol L⁻¹, SAR de 1.94, ESP de 2.90, salinidad efectiva (SE) de 3.07. Las características microbiológicas del agua potable fueron las siguientes: coliformes

Tabla 1. Especies halófitas encontradas en el municipio de Villamar, Michoacán, México.**Table 1.** Halophyte species found in the municipality of Villamar, Michoacán, México.

Familia	Especies	Situación migratoria en México	Ciclo vital	Uso antropogénico	Referencias
Aizoáceas	<i>Sesuvium verrucosum</i> Raf.	Nativo	Perenne	Medicinal y fitodesalinización	Taha y Alsayed (2000) Lastiri Hernández <i>et al.</i> (2020)
Boragináceas	<i>Heliotropium curassavicum</i> L.	Nativo	Anual- perenne	Medicinal y fitodesalinización	Pothiraj <i>et al.</i> (2021) Singh y Sharma (2017) Rabhi <i>et al.</i> (2015).
Scrophulariaceae	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst	Nativo	Perenne	Medicinal y fitodesalinización	Mehta <i>et al.</i> , (2022). Lastiri Hernández <i>et al.</i> (2020)
Asteráceas	<i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	Nativo	Anual	Medicinal y fitorremediación de metales	Surwase y Patil (2022). Franco Hernández <i>et al.</i> (2010)
Poáceas	<i>Distichlis spicata</i> L.	Nativo	Perenne	Forrajes y fitodesalinización	Matichenkov y Bocharnikova (2022)

totales de 17 NMP/100 mL, coliformes fecales de 3 NMP/100 mL y *Escherichia coli* de 3 NMP/100 mL.

El proceso de fitodesalinización se realizó en condiciones de invernadero, con una temperatura y humedad relativa promedio de 36/10 °C (día/noche) y 60 % (± 10 %), respectivamente.

Capacidad de fitodesalinización (PHC) y contenido total de Na⁺

Al final del proceso de fitodesalinización se tomaron diez plantas de cada especie (Tabla 1) para determinar la PHC y el contenido total de Na⁺. La PHC (Tabla 2) de las halófitas se cuantificó utilizando la cantidad de Na⁺ acumulado en la parte aérea de sus tejidos y el peso seco (DW) obtenido a los 180 d después del trasplante (ddt) (Rabhi *et al.*, 2010).

Para la obtención del DW de las halófitas, éstas se secaron en un horno Terlab® BTC-9100 a 70 °C durante 48 h. Para la obtención del contenido en Na⁺, las halófitas una vez secas, se trituraron y utilizando un microondas Anton Paar Multiwave Go se les realizó una digestión ácida. Los extractos se filtraron a través de papel de filtro y la concentración de Na⁺ se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica (Allen 1989) utilizando un espectrómetro SensAA

GBC (México).

Preparación de los BFL

En una segunda etapa, se utilizaron biodigestores tipo Batch con capacidad de 60 L por un período de 150 d para la obtención de los BFL (Figura 1). Se utilizó un biodigestor para cada una de las especies halófitas y uno más que correspondió a estiércol bovino (obtenido en Jiquilpan Michoacán), el cual se consideró como referencia. Los BFL se elaboraron a partir de una mezcla en volumen de 1/3 de planta (cortada en segmentos de 1 a 2.5 cm) equivalente a 15.5 L y 2/3 de agua potable equivalente a 31 L, dejando un espacio de cabeza de 15 cm para cada uno de los biodigestores. También, se buscó que el peso de la biomasa fresca (FW) (únicamente de la parte aérea) utilizada en cada biodigestor fuera equitativo, por lo que a cada biodigestor se le añadió 14 \pm 0.168 kg de planta; equivalente a 14.6 plantas de la especie *B. monnieri*, 16.2 plantas de la especie *D. spicata*, 6.7 plantas de la especie *H. curassavicum*, 10.3 plantas de la especie *F. trinervia* y 5.6 plantas de la especie *S. verrucosum*. El experimento se realizó por triplicado en una misma corrida experimental.

Para completar el proceso de digestión anaerobia, los

Tabla 2. Capacidad de fitodesalinización (PHC) y contenido total de Na⁺ en la biomasa de las especies halófitas al término de 180 d.**Table 2.** Phytodesalination capacity (PHC) and total Na⁺ content in the biomass of halophyte species at the end of 180 d.

Halófitas	Parámetros			
	Peso fresco (FW) (g planta ⁻¹)	Peso seco (DW) (g planta ⁻¹)	CPH (g planta ⁻¹)	Contenido total de Na ⁺ (g planta ⁻¹)
<i>B. monnieri</i>	954.72 ^d \pm 19.18	101.10 ^d \pm 1.39	1.67 ^d \pm 0.08	2.86 ^d \pm 0.43
<i>D. spicata</i>	863.89 ^e \pm 17.25	64.79 ^e \pm 1.25	0.72 ^e \pm 0.03	1.20 ^e \pm 0.05
<i>H. curassavicum</i>	2078.4 ^b \pm 33.24	256.89 ^b \pm 4.06	10.80 ^b \pm 0.43	15.72 ^b \pm 0.54
<i>F. trinervia</i>	1352.2 ^c \pm 28.38	205.53 ^c \pm 4.27	4.03 ^c \pm 0.13	5.98 ^c \pm 0.18
<i>S. verrucosum</i>	2485.5 ^a \pm 43.72	340.26 ^a \pm 5.95	16.60 ^a \pm 0.58	24.05 ^a \pm 1.12

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores son la media \pm desviación estándar ($n = 50$).

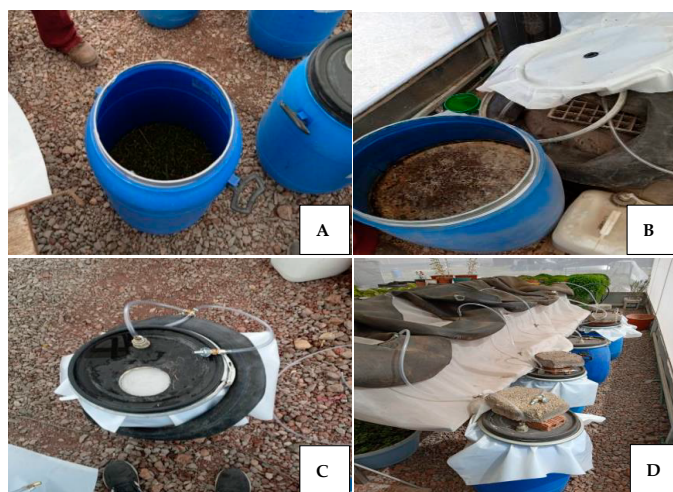


Figura 1. Proceso de digestión anaeróbica de las diferentes halófitas (AD).
Figure 1. Anaerobic digestion process of the different halophytes (AD).

biodigestores se colocaron en el mismo invernadero donde se realizó el proceso de fitodesalinización (Figura 1). El agua de riego utilizada fue la misma que la que se usó durante el proceso de la fitodesalinización.

Análisis químico de los BFL

Al término del proceso de la digestión anaerobia (150 días), la parte sólida y líquida de los BFL se separaron por filtración, a través de una malla milimétrica plástica, posteriormente, se tomó una muestra de 500 mL de la fracción líquida de cada biodigestor y se analizaron los siguientes parámetros: pH y CE, carbono orgánico total (Nelson & Sommers, 1983),

nitrógeno total Kjeldahl (Bremner & Mulvaney, 1982). Los macronutrientes y micronutrientes, como P, K, Ca, Mg, Na, Cl, S, Fe, Cu, Zn, Mn y B, se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (Allen, 1989) utilizando un espectrómetro SensAA. GBC (México). La caracterización química de los BFL se muestra en la Tabla 3.

Viabilidad y germinación de semillas Capacidad de hidratación de las semillas

La viabilidad de las semillas de zanahoria (*D. carota* L.), lechuga (*L. sativa* L.), rábano (*R. sativus* L.) y pepino (*C. sativus* L.) se determinó mediante el método de flotación. Las semillas que pasaron la prueba de flotación se usaron para probar su capacidad de hidratación (imbibición) en respuesta a los BFL. En ello, se evaluaron tres concentraciones de BFL: 0.25:5 (5%), 1:10 (10%), 1:5 (20%). Se trabajó con 96 tratamientos (Tabla 4), obtenidos a partir de la combinación de seis tipos de BFL, de las cuatro especies hortícolas (semillas), las tres concentraciones de BFL, y un tratamiento control usando agua destilada estéril, para cada una de las especies hortícolas. El experimento se repitió cinco veces (96 x 5). Las semillas utilizadas en la investigación fueron semillas certificadas de la marca; Rancho Los Molinos.

Para la imbibición, se pesaron (por tratamiento) 20 semillas de la hortaliza correspondiente, las cuales posteriormente se sembraron en cajas Petri y sobre un papel filtro humedecido con 10 mL del tipo y concentración de BFL correspondiente. Posteriormente, las cajas Petri se colocaron en una cámara de germinación (Thermo Scientific), a 25 °C. Pasadas 12 h, las semillas de cada especie y tratamiento se

Tabla 3. Composición nutricional de los diferentes BFL en su estado concentrado (100 %).

Table 3. Nutritional composition of the different liquid biofertilizers in their concentrated state (100 %).

Parámetros	Tratamientos											
		T1	T2	T3	T4	T5	T6					
pH		7.19 ^c ± 0.05	7.35 ^{bc} ± 0.06	7.21 ^c ± 0.05	7.79 ^a ± 0.05	7.54 ^b ± 0.06	7.94 ^a ± 0.05					
CE (dS m ⁻¹)		9.25 ^a ± 0.37	3.71 ^d ± 0.16	2.01 ^e ± 0.14	8.40 ^b ± 0.31	5.75 ^c ± 0.25	10.8 ^a ± 0.32					
Macronutrientes (mg L ⁻¹)	C	195.7 ^a ± 8.61	95.8 ^c ± 4.65	45.3 ^d ± 2.27	110.3 ^c ± 5.12	136.7 ^b ± 6.82	158.5 ^b ± 7.75					
	N	1180 ^b ± 54.8	465 ^e ± 13.4	173 ^f ± 8.5	960 ^c ± 15.2	842 ^d ± 17.1	1242 ^a ± 20.6					
	P	242 ^a ± 4.6	62 ^e ± 2.1	47 ^f ± 2.5	96 ^c ± 2.9	79 ^d ± 1.4	118 ^b ± 3.6					
	K	3120 ^a ± 153	490 ^e ± 13	192 ^f ± 18	1022 ^c ± 22	884 ^d ± 20	1294 ^b ± 23					
Micronutrientes (mg L ⁻¹)	Ca	1175 ^{bc} ± 44	652 ^d ± 25	418 ^e ± 24	1215 ^b ± 29	1142 ^c ± 28	1605 ^a ± 30					
	Mg	628 ^e ± 1.6	1049 ^d ± 2.1	505 ^f ± 1.8	2594 ^b ± 2.3	1535 ^c ± 2.4	3310 ^a ± 2.4					
	Cl	825 ^e ± 21	1073 ^d ± 46	529 ^f ± 44	2618 ^b ± 51	1558 ^c ± 49	3334 ^a ± 54					
	S	10.4 ^f ± 0.27	58.5 ^b ± 0.22	12.3 ^e ± 0.31	44.8 ^c ± 0.66	32.5 ^d ± 1.23	69.8 ^a ± 0.91					
	Fe	4.2 ^a ± 0.11	1.3 ^e ± 0.03	1.5 ^d ± 0.05	2.4 ^b ± 0.06	1.6 ^d ± 0.05	1.8 ^c ± 0.04					
	Cu	1.7 ^a ± 0.06	0.5 ^e ± 0.01	0.9 ^b ± 0.03	0.4 ^f ± 0.01	0.6 ^d ± 0.02	0.8 ^c ± 0.03					
	Zn	10.2 ^a ± 0.39	3.1 ^{de} ± 0.11	2.5 ^e ± 0.09	5.8 ^b ± 0.23	3.2 ^d ± 0.13	4.4 ^c ± 0.16					
	Mn	0.26 ^a ± 0.01	0.08 ^d ± 0.003	0.06 ^e ± 0.002	0.15 ^b ± 0.005	0.1 ^c ± 0.003	0.11 ^c ± 0.004					
B	0.21 ^f ± 0.007	1.31 ^b ± 0.001	0.38 ^e ± 0.002	0.95 ^d ± 0.004	1.37 ^a ± 0.002	1.05 ^c ± 0.004						
Sodio (mg L ⁻¹)	Na	948 ^e ± 24	1431 ^d ± 53	706 ^f ± 51	3491 ^b ± 59	2078 ^c ± 57	4446 ^a ± 63					

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). T1 = BFL de estiércol bovino; T2 = BFL de *Bacopa monnieri* (L.) Wettst; T3 = BFL de *Distichlis spicata* L.; T4 = BFL de *Heliotropium curassavicum* L.; T5 = BFL de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr; T6 = BFL de *Sesuvium verrucosum* Raf.

Tabla 4. Establecimiento de los diferentes tratamientos.**Table 4.** Establishment of the different treatments.

Tratamientos	Concentraciones de BFL			
	Control (%)	Bajo (%)	Medio (%)	Alto (%)
T1 = Estiércol Bovino	0	5	10	20
T2 = <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst	0	5	10	20
T3 = <i>Distichlis spicata</i> L.	0	5	10	20
T4 = <i>Heliotropium curassavicum</i> L.	0	5	10	20
T5 = <i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	0	5	10	20
T6 = <i>Sesuvium verrucosum</i> Raf.	0	5	10	20

pesaron nuevamente, utilizando una balanza analítica (SA 120, Scientech Inc., CO, EE. UU.).

Germinación de semillas

Después de registrar la capacidad de hidratación (imbibición) de las semillas, las cajas Petri se volvieron a colocar en la cámara de germinación (Thermo Scientific) a 25 °C y 65 % de humedad relativa durante cinco días. Los bioensayos de germinación se realizaron según la metodología propuesta por Zucconi *et al.*, (1981).

Pasados los cinco días, se evaluó el porcentaje de germinación relativo (PGR), el crecimiento relativo de la radícula (CRR), el índice de germinación (IG) (Tiquia, 2010) y la longitud total de las plántulas (LT) de cada especie (raíz + hipocótilo) en mm, la cual se registró con un calibrador digital Vernier 14388 de la marca Truper®. Las semillas se consideraron germinadas si la radícula sobresalía a través de la cubierta seminal de la semilla (2 mm) (Figura 2) (Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

Análisis estadístico



Figura 2. Efecto del BFL de *H. curassavicum* en la germinación de pepino (*Cucumis sativus* L.). a) control, b) concentración de BFL al 5 %, c) concentración de BFL al 10 % y d) concentración de BFL al 20 %.

Figure 2. Effect of *H. curassavicum* BFL on cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. a) control, b) 5 % BFL concentration, c) 10 % BFL concentration and d) 20 % BFL concentration.

Los datos obtenidos de las variables evaluadas fueron promediados y sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$) y a la prueba de homogeneidad de varianza de Levene. Las variables que cumplieron ambas pruebas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables que no cumplieron con las pruebas de homogeneidad de varianza o normalidad se transformaron al logaritmo natural (Ln) hasta observar normalidad y homocedasticidad, luego se calcularon las pruebas ANOVA y Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos que no cumplieron con ambas pruebas se sometieron a un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y pruebas de suma de rangos de Wilcoxon. Para todos los casos se utilizó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1 (SAS Institute Inc., 2004).

RESULTADOS

En todas las semillas evaluadas (zanahoria, lechuga, rábano y pepino) se observaron reducciones significativas ($p \leq 0.05$) en la ganancia de peso húmedo (imbibición) con respecto a los controles, a medida que aumentaba la concentración de BFL (Tabla 5). Siendo los tratamientos T6, T4 y T5 los que presentaron los menores niveles de imbibición. La afectación observada en las semillas, de acuerdo con los diferentes tipos y concentraciones de BFL establecidos, se clasificaron de la siguiente manera: *L. sativa* > *D. carota* > *C. sativus* > *R. sativus*; T6 > T4 > T5 > T2 > T3 > T1; 20 % > 10 % > 5 %.

En la imbibición de las semillas de *D. carota* y *C. sativus*, con el uso de BFL al 5 %, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los controles en los tratamientos T4, T5 y T6, mientras que para la imbibición de las semillas de *L. sativa* y *R. sativus*, los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6 mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los controles con el uso de la misma concentración de BFL (Tabla 5). Por otro lado, en la imbibición de las semillas de *D. carota* y *R. sativus*, T1 fue el único tratamiento que mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los controles únicamente a partir de la concentración de BFL al 20 %. Sin embargo, en la imbibición de las semillas de *L. sativa* y *C. sativus*, el tratamiento T1 mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los controles a partir de concentraciones de BFL al 10 % (Tabla 5).

Los resultados de las etapas de germinación y emergencia de las diferentes semillas hortícolas evaluadas se muestran en la Tabla 6. En donde se pudieron observar reducciones significativas ($p \leq 0.05$) en el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR), índice de germinación (IG) y en la longitud total de las plántulas (LT), respecto a los controles, a medida que aumentaban las concentraciones de BFL establecidas; siendo T6, T4 y T5 respectivamente, los tratamientos que presentaron los niveles más bajos de germinación y emergencia.

Tabla 5. Imbibición de 20 semillas de cuatro tipos de hortalizas.
Table 5. Imbibition of 20 seeds of four types of vegetables.

Especies	Concentración de BFL	Peso seco inicial (g)	Peso húmedo final (g)					
			I	T1	T2	T3	T4	T5
<i>Daucus carota</i> L.	0 %	0.0147 ± 0.0008	0.0330 ^a ± 0.0006	0.0330 ^a ± 0.0006	0.0330 ^a ± 0.0006	0.0330 ^a ± 0.0006	0.0330 ^a ± 0.0006	0.0330 ^a ± 0.0006
	5 %		0.0322 ^a ± 0.0007	0.0309 ^a ± 0.0009	0.0316 ^a ± 0.0006	0.0287 ^b ± 0.0005	0.0294 ^b ± 0.0005	0.0276 ^c ± 0.0005
	10 %		0.0304 ^a ± 0.0005	0.0263 ^c ± 0.0006	0.0285 ^b ± 0.0007	0.0233 ^c ± 0.0006	0.0247 ^d ± 0.0005	0.0208 ^f ± 0.0006
	20 %		0.0276 ^c ± 0.0005	0.0231 ^e ± 0.0008	0.0253 ^d ± 0.0005	0.0194 ^g ± 0.0006	0.0212 ^f ± 0.0007	0.0164 ^h ± 0.0007
<i>Lactuca sativa</i> L.	0 %	0.0191 ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007	0.0621 ^a ± 0.0007
	5 %		0.0615 ^a ± 0.0006	0.0585 ^b ± 0.0005	0.0593 ^b ± 0.0008	0.0562 ^d ± 0.0006	0.0581 ^c ± 0.0005	0.0544 ^e ± 0.0007
	10 %		0.0534 ^e ± 0.0006	0.0468 ^g ± 0.0006	0.0507 ^f ± 0.0005	0.0388 ⁱ ± 0.0006	0.0415 ^h ± 0.0007	0.0353 ^j ± 0.0006
	20 %		0.0442 ^g ± 0.0008	0.0366 ⁱ ± 0.0009	0.0404 ^h ± 0.0008	0.0295 ^k ± 0.0009	0.0323 ^j ± 0.0008	0.0269 ^l ± 0.0008
<i>Raphanus sativus</i> L.	0 %	0.2024 ± 0.00028	0.4436 ^a ± 0.0021	0.4436 ^a ± 0.0021	0.4436 ^a ± 0.0021	0.4436 ^a ± 0.0021	0.4436 ^a ± 0.0021	0.4436 ^a ± 0.0021
	5 %		0.4404 ^a ± 0.0024	0.4287 ^c ± 0.0027	0.4397 ^b ± 0.0020	0.4137 ^e ± 0.0023	0.4231 ^d ± 0.0020	0.4081 ^f ± 0.0025
	10 %		0.4415 ^a ± 0.0022	0.4108 ^e ± 0.0026	0.4264 ^c ± 0.0023	0.3912 ^h ± 0.0025	0.3988 ^g ± 0.0021	0.3842 ⁱ ± 0.0027
	20 %		0.4195 ^d ± 0.0029	0.3874 ^f ± 0.0025	0.4019 ^g ± 0.0027	0.3596 ^k ± 0.0023	0.3742 ^j ± 0.0028	0.3395 ^l ± 0.0026
<i>Cucumis sativus</i> L.	0 %	0.6178 ± 0.00077	1.2953 ^a ± 0.0075	1.2953 ^a ± 0.0075	1.2953 ^a ± 0.0075	1.2953 ^a ± 0.0075	1.2953 ^a ± 0.0075	1.2953 ^a ± 0.0075
	5 %		1.2892 ^a ± 0.0081	1.2817 ^a ± 0.0071	1.2846 ^a ± 0.0092	1.2518 ^b ± 0.0081	1.2796 ^a ± 0.0088	1.2275 ^c ± 0.0069
	10 %		1.1946 ^d ± 0.0082	1.0939 ^g ± 0.0073	1.1413 ^f ± 0.0071	0.9922 ^j ± 0.0076	1.0364 ⁱ ± 0.0083	0.9498 ^l ± 0.0087
	20 %		1.1795 ^e ± 0.0077	0.9787 ^h ± 0.0081	1.0642 ^h ± 0.0083	0.8775 ^e ± 0.0092	0.9217 ^m ± 0.0070	0.8054 ⁿ ± 0.0095

Las diferentes letras representan la mínima diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores son la media \pm desviación estándar ($n = 480$). T1 = BFL de estiércol bovino; T2 = BFL de *Bacopa monnieri* (L.) Wettst; T3 = BFL de *Distichlis spicata* L.; T4 = BFL de *Heliotropium curassavicum* L.; T5 = BFL de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr; T6 = BFL de *Sesuvium verrucosum* Raf.

Los niveles de afectación observados en la germinación y emergencia de las diferentes semillas hortícolas, según los diferentes tipos y concentraciones de BFL evaluados, se clasificaron como: *L. sativa* > *D. carota* > *C. sativus* > *R. sativus*; T6 > T4 > T5 > T2 > T3 > T1; 20 % > 10 % > 5 %, el cual es el mismo patrón identificado en la imbibición.

Como se refirió anteriormente, en todas las variables evaluadas (PGR, CRR, IG y LT) los mejores resultados se presentaron en los controles (0 %), seguidos del BFL al 5 %. En los tratamientos con BFL, las semillas de *D. carota* y *L. sativa*, con concentraciones de BFL al 5 %, mostraron diferencias significativas respecto a los controles en los tratamientos T2, T3, T4, T5, y T6. En el caso de las semillas de *R. sativus*, las diferencias se dieron en los tratamientos T2, T4, T5 y T6 y en las semillas de *C. sativus*, únicamente en los tratamientos T4 y T6 con la misma concentración de BFL (Tabla 6).

En cuanto a las tres concentraciones de BFL, las especies hortícolas mostraron los valores más altos de PGR con los BFL al 5 %. En las semillas de *C. sativus* se logró un PGR mayor a 92.22 %, en las de *R. sativus* uno mayor a 91.11 %, en las de *L. sativa* uno mayor a 87.77 %, y en las de *D. carota* uno mayor a 85.55 %. Sin embargo, con el uso de los BFL al 20 %, *R. sativus* fue la única que logró un PGR significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en comparación con el resto de las especies, al mostrar un valor mínimo en T6 de 71.11 % y un valor máximo en T1 de 93.33 %, ya que, *C. sativus* mostró un valor mínimo en T6 de 62.22 % y uno máximo en T1 de 90 %, *D. carota* un valor mínimo en T6 de 51.11 % y uno máximo en T1 de 85.55 % y *L. sativa* un valor mínimo en T6 de 40 % y uno máximo en T1

de 70 %. Por lo que T1 fue el que mostró un PGR mayor, con una dosis de BFL al 20 %.

En cuanto a las variables, CRR, IG y LT, los mejores resultados (después del control) se dieron utilizando BFL al 5 %, mientras que los menos favorables, utilizando los BFL al 20 %. En las semillas de *C. sativus*, con BFL al 5 %, la mayor reducción respecto al control se dio en el T6 (14.98 % en CRR, 31.32 % en IG y 18.02 % en LT), mientras que usando el BFL al 20 %, y contemplando todos los tratamientos, la reducción varió del 21.13 al 62.79 % en CRR, del 33.20 al 71.71 % en IG y del 25.29 al 60.26 % en LT. En las semillas de *R. sativus*, con BFL al 5 %, la mayor reducción respecto al control se dio en el T6 (22.01 % en CRR, 30.42 % en IG y 26.08 % en LT), mientras que usando el BFL al 20 %, y contemplando todos los tratamientos, la reducción varió del 12.18 al 39.30 % en CRR, del 28.22 al 47.64 % en IG y del 25.54 al 48.18 % en LT.

En las semillas de *L. sativa*, con el BFL al 5 %, la mayor reducción respecto al control se dio en el T6 (26.86 % en CRR, 45.32 % en IG y 20.15 % en LT), mientras que usando el BFL al 20 %, y contemplando todos los tratamientos, la reducción varió del 36.56 al 62.36 % en CRR, del 52.08 al 69.39 % en IG y del 28.22 al 57.13 % en LT. En las semillas de *D. carota*, con el BFL al 5 %, la mayor reducción respecto al control se dio en el T6 (32.64 % en CRR, 45.91 % en IG y 55.27 % en LT), mientras que usando el BFL al 20 %, y contemplando todos los tratamientos, la reducción varió del 21.06 al 55 % en CRR, del 38.86 al 63.09 % en IG y del 55.48 al 70.77 % en LT.

Tabla 6. Efectos de las diferentes concentraciones de los diferentes BFL sobre el crecimiento y germinación de cuatro especies de hortalizas.

Tratamientos	Parámetros	Especies															
		<i>Daucus carota</i> L			<i>Lactuca sativa</i> L			<i>Raphanus sativus</i> L			<i>Cucumis sativus</i> L						
		Concentraciones de BFL			Concentraciones de BFL			Concentraciones de BFL			Concentraciones de BFL						
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	
T1	PGR	1000±1.1	9888±1.1	9000±1.1	8555±1.1	1000±1.1	1000±1.1	8666±1.1	7000±1.1	1000±1.1	1000±1.1	9777±1.1	9333±1.1	1000±1.1	1000±1.1	9555±1.1	9000±1.1
	GRR	77.92±1.6	72.25±1.4	66.82±1.1	61.51±1.0	96.27±1.9	95.82±1.9	74.92±1.5	61.07±1.2	127.2±2.5	124.4±2.5	116.8±2.3	111.7±2.2	68.03±1.3	67.63±1.3	61.80±1.2	53.65±1.1
	IG	77.92±1.6	58.41±0.9	51.97±0.9	47.64±0.8	96.27±1.9	95.82±1.9	59.40±1.1	46.13±1.1	127.2±2.5	124.4±2.5	104.6±2.1	91.3±2.0	68.03±1.3	67.63±1.3	50.79±0.9	45.44±0.9
	LT	23.54±0.4	12.53±0.2	11.75±0.2	10.48±0.1	13.25±0.2	13.17±0.2	10.91±0.2	9.51±0.1	110.8±2.2	109.2±2.2	88.2±1.8	82.5±1.7	44.52±0.8	44.26±0.8	37.41±0.7	33.26±0.7
T2	PGR	1000±1.1	9333±1.1	7888±1.1	71.11±1.1	1000±1.1	9666±1.1	74.44±1.1	57.77±1.1	1000±1.1	96.66±1.1	93.33±1.1	84.44±1.1	1000±1.1	1000±1.1	84.44±1.1	75.55±1.1
	GRR	77.92±1.6	66.63±1.2	57.35±1.0	51.18±0.9	96.27±1.9	82.81±1.6	65.88±1.3	51.02±1.0	127.2±2.5	118.6±2.3	108.0±2.2	96.0±2.1	68.03±1.3	66.09±1.3	50.87±1.1	41.86±0.9
	IG	77.92±1.6	52.58±0.8	42.61±0.8	38.67±0.7	96.27±1.9	65.55±1.3	50.95±1.0	40.38±0.8	127.2±2.5	106.2±2.1	98.7±2.0	81.9±1.9	68.03±1.3	66.09±1.3	39.35±0.8	33.32±0.7
	LT	23.54±0.4	11.90±0.2	10.07±0.1	8.82±0.1	13.25±0.2	12.29±0.2	9.67±0.1	7.82±0.1	110.8±2.2	90.4±1.8	83.5±1.7	72.7±1.5	44.52±0.8	42.94±0.8	31.68±0.6	24.72±0.5
T3	PGR	1000±1.1	9555±1.1	8555±1.1	76.66±1.1	1000±1.1	9777±1.1	82.22±1.1	64.44±1.1	1000±1.1	100.0±1.1	96.66±1.1	92.22±1.1	1000±1.1	1000±1.1	87.77±1.1	82.22±1.1
	GRR	77.92±1.6	67.97±1.3	61.64±1.1	55.89±1.0	96.27±1.9	83.43±1.6	70.38±1.4	52.92±1.1	127.2±2.5	122.8±2.5	115.3±2.3	107.1±2.1	68.03±1.3	67.42±1.3	50.01±1.1	46.18±1.0
	IG	77.92±1.6	53.55±0.9	47.93±0.8	42.76±0.7	96.27±1.9	66.57±1.3	56.54±1.1	41.25±0.9	127.2±2.5	122.8±2.5	103.4±2.1	88.2±1.9	68.03±1.3	67.42±1.3	40.75±0.9	39.67±0.8
	LT	23.54±0.4	12.10±0.2	10.52±0.1	9.93±0.1	13.25±0.2	12.45±0.2	10.43±0.2	8.50±0.1	110.8±2.2	107.6±2.1	87.9±1.8	75.3±1.6	44.52±0.8	43.38±0.8	33.31±0.6	27.72±0.6
T4	PGR	1000±1.1	8777±1.1	71.11±1.1	57.77±1.1	1000±1.1	9000±1.1	61.11±1.1	46.66±1.1	1000±1.1	92.22±1.1	92.22±1.1	76.66±1.1	1000±1.1	95.55±1.1	76.66±1.1	67.77±1.1
	GRR	77.92±1.6	55.62±1.3	51.06±0.9	41.84±0.7	96.27±1.9	73.71±1.5	51.29±1.0	40.12±0.8	127.2±2.5	106.5±2.1	104.7±2.1	86.7±1.9	68.03±1.3	62.12±1.2	41.57±1.0	31.21±0.8
	IG	77.92±1.6	45.92±1.1	38.24±0.7	31.52±0.5	96.27±1.9	57.87±1.2	40.97±0.8	31.80±0.6	127.2±2.5	90.7±1.8	89.4±1.9	73.0±1.7	68.03±1.3	50.45±1.0	36.89±0.8	23.58±0.7
	LT	23.54±0.4	10.67±0.1	8.98±0.1	7.33±0.1	13.25±0.2	11.47±0.2	8.21±0.1	6.27±0.1	110.8±2.2	82.4±1.7	75.2±1.6	63.2±1.5	44.52±0.8	37.50±0.7	25.45±0.5	19.44±0.5
T5	PGR	1000±1.1	9000±1.1	75.55±1.1	63.33±1.1	100±1.1	92.22±1.1	66.66±1.1	51.11±1.1	1000±1.1	95.55±1.1	92.22±1.1	84.44±1.1	1000±1.1	98.88±1.1	82.22±1.1	71.11±1.1
	GRR	77.92±1.6	61.76±1.1	52.26±0.9	46.32±0.7	96.27±1.9	78.38±1.6	57.91±1.1	45.32±0.9	127.2±2.5	113.3±2.2	104.8±2.1	91.2±2.0	68.03±1.1	65.05±1.2	47.14±1.0	33.21±0.8
	IG	77.92±1.6	48.28±0.9	41.44±0.7	35.45±0.6	96.27±1.9	60.42±1.2	45.80±0.9	34.87±0.7	127.2±2.5	95.7±2.0	90.2±1.9	79.3±1.8	68.03±1.1	55.54±1.0	40.68±0.8	25.58±0.7
	LT	23.54±0.4	11.17±0.2	9.87±0.1	7.98±0.1	13.25±0.2	11.68±0.2	8.85±0.1	6.93±0.1	110.8±2.2	89.1±1.7	81.2±1.6	67.4±1.5	44.52±0.8	40.18±0.7	28.39±0.6	22.84±0.6
T6	PGR	1000±1.1	8555±1.1	63.33±1.1	51.11±1.1	1000±1.1	8777±1.1	57.77±1.1	40.00±1.1	1000±1.1	91.19±1.1	85.55±1.1	71.11±1.1	1000±1.1	92.22±1.1	72.22±1.1	62.22±1.1
	GRR	77.92±1.6	52.49±0.9	45.75±0.8	35.06±0.6	96.27±1.9	70.41±1.5	46.74±1.0	36.23±0.7	127.2±2.5	99.2±2.2	95.6±2.0	77.2±1.8	68.03±1.3	54.95±1.1	34.19±0.9	23.31±0.8
	IG	77.92±1.6	42.15±0.8	32.16±0.6	28.76±0.5	96.27±1.9	52.64±1.1	35.15±0.8	29.46±0.5	127.2±2.5	88.5±2.0	82.3±1.8	66.6±1.6	68.03±1.3	46.72±0.9	26.44±0.7	19.24±0.6
	LT	23.54±0.4	10.53±0.1	8.11±0.1	6.88±0.1	13.25±0.2	10.58±0.2	7.75±0.1	5.68±0.1	110.8±2.2	81.9±1.7	68.1±1.6	57.5±1.4	44.52±0.8	34.86±0.7	23.57±0.5	17.69±0.4

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p≤0.05). Los valores son la media ± desviación estándar (n = 1 440). Porcentaje de Germinación Relativo (GRR), Crecimiento Relativo de Raíz (CRR), Índice de Germinación (IG) y Longitud Total (LT; longitud de raíz + hipocotilo). T1 = BFL de *estírcol* bovino; T2 = BFL de *Bacopa monnieri* (L.) Wettst; T3 = BFL de *Distichlis spicata* L.; T4 = BFL de *Heliotropium curassavicum* L.; T5 = BFL de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr; T6 = BFL de *Sesuvium verucosum* Raf.

DISCUSIÓN

BFL producidos a partir de halófitas

La eficiencia de los BFL está sujeta diversos factores, como: el método de preparación, el tiempo de DA, la temperatura dentro del biodigestor (mesófila, termófila), el estado fenológico y los microorganismos endógenos de las plantas (Bitew y Alemayehu, 2017; de-Oliveira-Neto *et al.*, 2017).

Por lo que autores como Kumar-Pramanik *et al.* (2019) y Tuszynska *et al.* (2021) sugieren periodos de 30 a 70 días para la obtención de los BFL; es el tiempo en que normalmente termina la producción de biogás (Pham-Van *et al.*, 2020). Sin embargo, autores como Pérez-Méndez *et al.* (2017), sugieren un periodo de 120 días, para obtener un BFL estable y maduro. Por lo tanto, en la presente investigación se consideró adecuado un periodo de 150 d, puesto que, de acuerdo con Mupambwa *et al.* (2020) largos periodos de degradación generan abonos orgánicos con mayor contenido nutrimental.

De acuerdo con Barampouti *et al.* (2020), los valores de pH para BFL obtenidos a partir de residuos vegetales (plantas), se encuentra entre 7 y 8.4. Valores similares a los obtenidos en la presente investigación (Tabla 3). En cuanto a la CE de los BFL, Valentinuzzi *et al.* (2020) reportan un valor de 4.6 dS m⁻¹ para un BFL obtenido de la Biogas Wipptal plant y un valor de 9.4 dS m⁻¹ para el obtenido a partir de estiércol bovino; este último valor coincide con el reportado en la presente investigación. Sin embargo, la CE de los BFL obtenidos a partir de halófitas, es mayor a 4.6 dS m⁻¹ (entre 5.15 y 6.18 dS m⁻¹) lo cual puede explicarse debido a que presentan un mayor contenido de los cationes: Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ (Santoyo-de-la-Cruz *et al.*, 2021). Aunque, cabe aclarar que el hecho de que la CE de los BFL sea elevada, no significa que se descarte su potencial función como biofertilizante, pues normalmente los BFL se utilizan disueltos en agua a razones que van del 5 al 25 % (Möller & Müller, 2012; Ladan *et al.*, 2020).

Otro de los aspectos importantes a considerar es el contenido nutrimental de los BFL. Dicho esto, los BFL obtenidos a partir de halófitas (Tabla 3), presentan concentraciones de N_{total}, C_{total}, P, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, significativamente menores a las de productos similares elaborados con estiércol bovino, porcino, de cuy y gallinaza (Medina *et al.*, 2015), únicamente comparándose al contenido nutrimental obtenido en BFL de estiércol ovino y al de la Fattoria della Piana, elaborado con estiércol de animales (aves de corral, vacas y ovejas), bagazo de aceituna y pulpa de cítricos (Medina *et al.*, 2015; Panuccio *et al.*, 2019).

Por otro lado, el aspecto más importante a considerar en los BFL obtenidos a partir de halófitas (T2 al T6; ver tabla 3), es su contenido en Na⁺, el cual supera los 2000 mg L⁻¹ en todos los tratamientos. Sin embargo, estudios como el realizado por Medina *et al.* (2015), indican que el BFL de estiércol porcino presenta concentraciones de Na⁺ de 3 400 mg L⁻¹, mientras que BFL elaborados a partir de estiércol bovino (1 040 mg L⁻¹), ovino (560 mg L⁻¹) y cuy (542 mg L⁻¹) presentan concentraciones de Na⁺ considerablemente más bajas. Por otro lado, Panuccio *et al.* (2021) reportan concentraciones de 3 500 mg

L⁻¹ de Na⁺ en un BFL obtenido a partir de la combinación de estiércol animal (aves de corral, vacas y ovejas), suero de leche y ensilado de maíz. Por lo tanto, el contenido en Na⁺, de los BFL obtenidos a partir de halófitas, no es elevado.

Imbibición de semillas

Altas concentraciones de NaCl (50, 100 y 200 mM), generan que disminuya la movilidad del agua y, por ende, también la velocidad de imbibición de las semillas, lo que afecta directamente a la síntesis de biopolímeros, proteínas, ácidos nucleicos y la cantidad de hormonas reguladoras de las células vegetales (Orlovsky *et al.*, 2016; Lastiri-Hernández *et al.*, 2017). En general, estos aspectos limitan la intensidad de los procesos de crecimiento conforme se desarrollan en la posterior etapa de germinación, donde intervienen algunos mecanismos fisiológicos de arranque relacionados con los primeros ciclos de división y diferenciación celular que surgen en el embrión, independientes de los productos de la hidrólisis de las sustancias de reserva de las semillas (Obroucheva, 2021).

Sumado a lo anterior, en la presente investigación, la respuesta diferencial entre las semillas de las diferentes especies (Tabla 5) podría deberse a que cada genotipo requiere un porcentaje crítico de agua para la germinación, producto de la dependencia de la naturaleza química de su reserva y compuestos estructurales (Acosta-Motos *et al.*, 2017), lo cual se pudo verificar cuando las semillas de las diferentes variedades evaluadas mostraron una reducción en su PGR mediante la aplicación de diferentes concentraciones de BFL (Tabla 6).

Sin embargo, las concentraciones de BFL utilizadas (5, 10 y 20 %), representan concentraciones por debajo de 50 mM de NaCl, lo cual explica por qué la disminución en el porcentaje de imbibición no fue drástica (Tabla 5), tal como si sucedió en el trabajo realizado por Lastiri-Hernández *et al.* (2017), donde se utilizaron semillas de especies forrajeras y concentraciones más elevadas de NaCl (50, 100 y 200 mM).

Germinación de semillas hortícolas

La salinidad es uno de los estreses abióticos más comunes que reduce tanto la capacidad de germinación como el potencial de emergencia de diversas especies hortícolas (Rouphael *et al.*, 2018; Sium *et al.*, 2019; Tarchoun *et al.*, 2022). En su investigación, Flowers *et al.* (2015) han indicado que el aumento de la concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ induce un aumento en la toxicidad iónica, el estrés hídrico y la reducción del potencial osmótico en las semillas, lo que se ve reflejado en la inhibición de la germinación y crecimiento de las especies hortícolas evaluadas; principalmente con concentraciones de BFL al 10 y 20 %, como se pudo comprobar al observar la reducción en su PGR, CRR, IG y LT (Tabla 6).

Sumado a lo anterior, es importante mencionar que los abonos orgánicos, como es el caso de los BFL, pueden presentar metabolitos fitotóxicos. Dicha fitotoxicidad generada por los metabolitos afecta el desarrollo de las especies hortícolas, es decir, pueden limitar el crecimiento de las plantas

y también impedir y/o retrasar su germinación (Urriola *et al.*, 2021).

De acuerdo con Emino y Warman, (2004) y Varnero *et al.* (2007), si el índice de germinación es inferior al 50 %, el material evaluado (en este caso el BFL) presenta una alta fitotoxicidad. Si estuvo entre 50 y 80 %, la fitotoxicidad fue moderada, y si su valor fue mayor a 80 %, el material no presentó fitotoxicidad. Por lo tanto, el presente estudio pudo verificar que, todas las especies hortícolas evaluadas con BFL al 5 % (Tabla 6) no presentaron fitotoxicidad alguna. En cambio, usando los BFL al 10 %, las semillas de *L. sativa* y *D. carota* en el T2, T4, T5 y T6 y las semillas de *C. sativus* en los T4 y T6, mostraron toxicidad moderada. Mientras que, usando los BFL al 20 % las semillas de *L. sativa* en los T4 y T6 presentaron una alta toxicidad. De acuerdo con Sarker *et al.* (2014) las semillas de *R. sativus* L., en presencia de un nivel de salinidad de 2 dS m⁻¹ presentan un PGR=100 %, mientras que con un nivel de 4 dS m⁻¹ presentan un PGR= 86.67 %. En la presente investigación, todos los BFL evaluados al 5, 10 y 20 %, se encuentran dentro de dicho intervalo; excepto los T4 y T6 usando BFL al 20 %, los cuales se encuentran cercanos a un nivel de salinidad de 8 dS m⁻¹. En cuanto al IG, los resultados de los BFL al 5, 10 y 20 %, fueron similares a los obtenidos por Krishnasamy *et al.* (2014) usando extractos de vermicompost (aserrín + biosol (desechos vegetales)), pero se encontraron por encima de los resultados obtenidos por Lastiri-Hernández *et al.* (2023) usando extractos de compost y vermicompost de *S. verrucosum*; ambas combinadas con diferentes cantidades de estiércol bovino. Respecto al CRR y LT, los resultados obtenidos con los BFL a partir de halófitas fueron significativamente mayores a los obtenidos por Sarker *et al.* (2014).

Respecto a las semillas de *L. sativa* L., el PGR, IG, CRR y LT obtenido en todos los tratamientos, utilizando los BFL al 5 % (Tabla 6), se asemejan a los resultados presentados por Medina *et al.* (2015) usando un BFL realizado a partir de estiércol ovino. Sin embargo, los resultados utilizando los BFL al 10 y 20 % se encuentran muy por debajo de los reportados por Medina *et al.* (2015). Por otro lado, para el PGR, Reina *et al.* (2020) usando una concentración salina de 0.045 M de NaCl, reporta resultados que representan un decremento aproximado del 40 %, comparado con los obtenidos con los BFL al 5 %, pero muy similares a los obtenidos usando los BFL al 10 y 20 %.

Hablando de *C. sativus* L., los resultados de PGR obtenidos en todos los tratamientos con BFL al 5, 10 y 20 %, son similares a los reportados por Abdel-Farid *et al.* (2020) usando respectivamente una concentración salina de 25, 50 y 100 mM de NaCl. Respecto a IG, CRR y LT, los resultados obtenidos con los BFL tanto al 5, 10 y 20 % (Tabla 6), son significativamente menores a los obtenidos por Baghbani *et al.* (2013) usando diferentes concentraciones salinas.

En cambio, en el caso particular de *D. carota* L., Bolton y Simon, (2019), reportan valores de PGR de 81.6 % utilizando una concentración salina de 150 mM, por lo cual, en la presente investigación solo los BFL usados al 5 % y los T1 y T3 usando los BFL al 10 %, superan dicho valor de PGR. El resto

de los tratamientos usando BFL al 10 % y todos los tratamientos con BFL al 20 %, se encuentran considerablemente por debajo.

Al comparar los resultados, es evidente que la respuesta frente a los BFL realizados, depende de la variación genética del germoplasma estudiado y su tolerancia a la salinidad (Tarchoun *et al.*, 2022).

CONCLUSIÓN

Se encontró que, de las cuatro especies hortícolas evaluadas, *R. sativus* fue la especie más tolerante a los diferentes niveles de concentración (5, 10 y 20 %) de BFL, seguida de *C. sativus*. En tanto que *D. carota* y *L. sativa*, fueron las especies que presentaron el mayor grado de afectación a partir de una concentración de BFL de 10 % lo cual se reflejó en el tamaño de la radícula y en la longitud del hipocótilo de estas mismas especies. Mientras que a una concentración de BFL del 20 %, todas las especies mostraron la mayor reducción en cuanto a IG, CRR, PGR y LT. Sin embargo, la concentración de BFL al 5%, mostró el mayor CRR, PGR, LT y un IG por encima del 85.55 % en todas las especies hortícolas evaluadas y con todos los tipos de BFL empleados. Por lo tanto, el uso del BFL, elaborados con halófitas, en dosis bajas (5 - 10 %) no representa un riesgo en la germinación y emergencia de especies hortícolas sensibles a la salinidad. Es por ello, que la producción de BFL elaborados a partir de halófitas, se posiciona como una importante estrategia agronómica que potencia el despliegue de la fitodesalinización y que proporciona una opción real para aprovechar la biomasa residual de las halófitas. Contribuyendo así a mejorar la situación económica de los sectores productivos más vulnerables y a garantizar su bienestar y desarrollo.

REFERENCIAS

- Abdel-Farid, I.B., Radawy-Marghany, M., Mahmoud-Rowezek, M. y Gabr-Sheded, M. 2020. Effect of Salinity Stress on Growth and Metabolomic Profiling of *Cucumis sativus* and *Solanum lycopersicum*. *Plants*. 9: 1626.
- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sánchez-Blanco, M.J. y Hernández, J.A. 2017. Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy*. 7: 1-38.
- Allen, S.E. 1989. Analysis of vegetation and other organic materials. En: *Chemical Analysis of Ecological Materials*. S.E. Allen (ed.), pp 46–61. Blackwell Scientific Publications. London.
- Baghbani, A., Forghani, A.H. y Kadkhodaie, A. 2013. Study of salinity stress on germination and seedling growth in greenhouse Cucumber cultivars. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 3: 1137-1140.
- Balkaya, A., Yildiz, S., Horuz, A. y Murat-Doğru, S. 2016. Effects of salt stress on vegetative growth parameters and ion accumulations in cucurbit rootstock genotypes. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*. 2: 11–24.
- Barampouti, E.M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K. y Loizidou, M. 2020. Exploring technological alternatives of nutrient recovery from digestate as a secondary resource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 134: 1-12.

- Beetle, A.A., Manrique, E.F., Jaramillo, V.L., Guerrero, P.S., Miranda, J.S., Nuñez, I.T. y Chimal, A.H. 1987. Las gramíneas de México. 1ª ed. Comisión Técnico-Consultiva de Coeficientes de Agostadero, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México.
- Bitew, Y. y Alemayehu, M. 2017. Impact of crop production inputs on soil health: A review. *Asian Journal of Plant Sciences*. 16: 109-131.
- Bolton, A. y Simon, P. 2019. Variation for salinity tolerance during seed germination in diverse carrot [*Daucus carota* (L.)] germplasm. *HortScience*. 54: 38-44.
- Bremner, J.M. y Mulvaney, C.S. 1982. Nitrogen-Total. En: *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. Vol. 2. A.L. Page, R.H. Miller y D.R. Keeney (ed.), pp 595-624. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.
- de-Oliveira-Neto, H.T., de-Oliveira-Gondim, A.R., da-Silva, F. V., Souto, L.S., Brito, M.E.B., da-Silva, M.S. y de-Lira, R.P. 2017. Growth, gas exchanges and production of beet cv. Katrina under organo-mineral fertilization. *Bioscience Journal*. 33: 1126-1133.
- Emino, E.R. y Warman, P.R. 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Science & Utilization*. 12: 342-348.
- Espinosa-García, F.J., Sarukhán, J. 1997. Manual de malezas del valle de México. Ediciones Científicas Universitarias UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.
- Flowers, T.J., Munns, R. y Colmer, T.D. 2015. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany*. 115: 419-431.
- Franco-Hernández, M.O., Vásquez-Murrieta, M.S., Patiño-Siciliano, A. y Dendooven, L. 2010. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. *Bioresource Technology*. 101: 3864-3869.
- Hernández-Chontal, M.A., López-Collado, C.J., Rodríguez-Orozco, N., Velasco-Velasco, J., Linares-Gabriel, A. y López-Romero, G. 2019. Nutrient content of fermented fertilizers and its efficacy in combination with hydrogel in *Zea mays* L. *International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture*. 8: 309-315.
- Kandil, A.A., Shareif, A.E. y Gad, M.A. 2017. Effect of salinity on germination and seeding parameters of forage cowpea seed. *Research Journal of Seed Science*. 10: 17-26.
- Kaur, G., Wong, J.W.C., Kumar, R., Patria, R.D., Bhardwaj, A., Uisan, K. y Johnravindar, D. 2020. Value Addition of Anaerobic Digestate From Biowaste: Thinking Beyond Agriculture. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*. 7: 48-55.
- Kumar-Pramanik, S., Binti-Suja, F., Md-Zain, S. y Kumar-Pramanik, B. 2019. The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. *Bioresource Technology Reports*. 8: 100310.
- Krishnasamy, K., Nair, J. y Bell, R. 2014. Evaluation of anaerobic digestate as a substrate for vermicomposting. *International Journal of Environment and Waste Management*. 14: 149-64.
- Lastiri-Hernández, M.A., Álvarez-Bernal, D., Soria-Martínez, L.H., Ochoa-Estrada, S. y Cruz-Cardenas, G. 2017. Efecto de la salinidad en la germinación y emergencia de siete especies forrajeras. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8: 1245-1257.
- Lastiri-Hernández, M.A., Álvarez-Bernal, D., Ochoa-Estrada, S. y Contreras-Ramos, S.M. 2019. Potential of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst and *Sesuvium verrucosum* Raf. as an agronomic management alternative to recover the productivity of saline soils. *International Journal of Phytoremediation*. 22: 343-352.
- Lastiri-Hernández, M.A., Álvarez-Bernal, D. y Ochoa-Estrada, S. 2020. Valoración económica de dos prácticas de desalinización: caso de estudio Villamar-Michoacán, México. *Revista Científica Eciencia*. 7: 57-75.
- Lastiri-Hernández, M.A., Álvarez-Bernal, D., Conde-Barajas, E. y García-Miranda, J.G. 2021. Biosaline agriculture: an agronomic proposal for onion (*Allium cepa* L.) production. *International Journal of Phytoremediation*. 23: 1301-1309.
- Lastiri-Hernández, M.A., Álvarez-Bernal, D., Conde-Barajas, E., Flores-Magallón, R., Silva-García, J.T. y Cruz-Cárdenas, G. 2023. Effects of *Sesuvium verrucosum* Raf. Compost and vermicompost on the growth and production parameters of the *Solanum lycopersicum* L., crop. *Bragantia*. 82: e20220162.
- Lastiri-Hernández, M. A., Cruz-Cárdenas, G., Álvarez-Bernal, D., Vázquez-Sánchez, M., & Bermúdez-Torres, K. 2020. Ecological niche modeling for halophyte species with possible anthropogenic use in agricultural saline soils. *Environmental Modeling & Assessment*. 25: 429-440.
- Ladan, W.H., Abba, H., Sale, A.I., Mardiyah, A.Y. y Yahaya, S.M. 2020. Organic liquid fertilizer for sustainable crop yield (A review). *Biosciences Journal FUDMA*. 1: 75-87.
- Larney, F.J. y Angers, D.A. 2012. The role of organic amendments in soil reclamation: A review. *Canadian Journal of Soil Science*. 92: 19-38.
- Majeed, A. y Muhammad, Z. 2019. Salinity: A major agricultural problem-causes, impacts on crop productivity and Management Strategies. En: *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular, and Biotechnological Approaches*. M. Hasanuzzaman, K.R. Hakeem, K. Nahar y H.F. Alharby (ed.), pp 83-99. Springer. Cham, Switzerland.
- Matichenkov, V.V. y Bocharnikova, E.A. 2022. Location and Redistribution of Silicon in Halophytes *Distichlis spicata* and Glycophyte *Hordeum vulgare* Under Salt Exposure. *Silicon*. 1: 1-8.
- McVaugh, R. 1984. *Flora Novo-Galiciana: Compositae*. University of Michigan press. Michigan, USA.
- Medina, A., Quipuzco, U.L. y Juscamaíta, M.J. 2015. Evaluación de la calidad de biol de segunda generación de estiércol de ovino producido a través de biodigestores. *Anales científicos*. 76: 116-124.
- Mehta, J., Utkarsh, K., Fuloria, S., Singh, T., Sekar, M., Salaria, D. y Fuloria, N.K. 2022. Antibacterial Potential of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and Its Bioactive Molecules against Uropathogens—An In Silico Study to Identify Potential Lead molecule (s) for the development of new drugs to treat urinary tract infections. *Molecules*. 27: 4971.
- Möller, K. y Müller, T. 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*. 12: 242-257.
- Mupambwa, H.A., Ravindran, B., Dube, E., Lukash, N.S., Katakula, A.A. y Mnkeni, P.N. 2020. Some perspectives on Vermicompost utilization in organic agriculture. En: *Earthworm Assisted Remediation of Effluents and Wastes*. S.A. Bhat, A.P. Vig, P. Li y B. Ravindran (ed.), pp 299-331. Springer. Singapore.
- Nelson, D.W. y Sommers, L.E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. En: *Methods of Soil Analysis*. Part 3. D. L. Sparks, *et al.*, (ed.), pp 961-1010. SSSA Book Series. Madison, Wisconsin, USA.
- Nikalje, G.C., Srivastava, A.K., Pandey, G.K. y Suprasanna, P. 2018.

- Halophytes in biosaline agriculture: Mechanism, utilization, and value addition. *Land Degradation and Development*. 29: 1091-1095.
- Obroucheva, N.V. 2021. Germination program in non-dormant seeds: Programming, saving and implementation. *Russian Journal of Plant Physiology*. 68: 1003–1017.
- Orlovsky, N., Japakova, U., Zhang, H. y Volis, S. 2016. Effect of salinity on seed germination, growth and ion content in dimorphic seeds of *Salicornia europaea* L. (Chenopodiaceae). *Plant Diversity*. 38: 183–189.
- Pablo-Pérez, M., Lagunes-Espinoza, L.D.C., López-Upton, J., Ramos-Juárez, J. y Aranda-Ibáñez, E.M. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de lupinus silvestres. *Bioagro*. 25: 101–108.
- Panuccio, M.R., Papalia, T., Attinà, E., Giuffrè, A. y Muscolo, A. 2019. Use of digestate as an alternative to mineral fertilizer: effects on growth and crop quality. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 65: 700-711.
- Panuccio, M.R., Mallamaci, C., Attinà, E. y Muscolo, A. 2021. Using Digestate as Fertilizer for a Sustainable Tomato Cultivation. *Sustainability*. 13: 1574.
- Pérez-Méndez, M., Peña-Peña, E., Hechemendía-Lago, S.A., Yero-Batista, Y. y Hechavarría-Hernández, A. 2017. Producción de biol y determinación de sus características fisicoquímicas. *Ojeando la Agenda*. 48: 6-17.
- Pham-Van, D., Fujiwara, T., Leu-Tho, B., Song-Toan, P.P. y Hoang-Minh, G. 2020. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. *Environmental Engineering Researc*. 25: 1-17:
- Pothiraj, C., Balaji, P., Shanthi, R., Gobinath, M., Suresh-Babu, R., Munirah, A.A.D., Ashraf, A.H., Ramesh-Kumar, K., Veeramanikandan, V. y Arumugam, R. 2021. Evaluating antimicrobial activities of *Acanthus ilicifolius* L., and *Heliotropium curassavicum* L., against bacterial pathogens: an *in-vitro* study. *Journal of Infection and Public Health*. 14: 1927–1934.
- Rabhi, M., Atia, A., Abdelly, C. y Smaoui, A. 2015. New parameters for a better evaluation of vegetative bioremediation, leaching, and phytodesalination. *Journal of Theoretical Biology*. 383: 7–11.
- Rabhi, M., Ferchichi, S., Jouini, J., Hamrouni, M. H., Koyro, H. W., Ranieri, A. & Smaoui, A. 2010. Phytodesalination of a salt-affected soil with the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. to arrange in advance the requirements for the successful growth of a glycophytic crop. *Bioresource technology*. 101: 6822-6828.
- Reina, S., Correa, M. y Freire, D. 2020. Toxicidad producida por compuestos salinos en el proceso de germinación de *Lactuca sativa*. *Revista Minerva de Investigación Científica*. 1: 5-12.
- Rouphael, Y., Petropoulos, S.A., Cardarelli, M. y Colla, G. 2018. Salinity as eustress or for enhancing quality of vegetables. *Scientia Horticulturae*. 234: 361–369.
- Rzedowski, G.C. y Rzedowski, J. 1985. Flora fanerogámica del valle de México. Vol.2, Dicotyledoneae (Euphorbiaceae-Compositae). 1ª edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología. México.
- Samaniego, J.J. 2022. Preparación de biol a partir de residuos orgánicos. *Red de Biodigestores para Latino América y el Caribe*. 6: 51–55.
- Santoyo-de-la-Cruz, M.F., Flores-Magdaleno, H., Khalil-Gardezi, A., Mancilla-Villa, O.R. y Rubiños-Panta, J.E. 2021. Composición iónica y comparación de índices de salinidad de suelo agrícola de Texcoco, México. *Nova Scientia*. 13: 1-20.
- Sarker, A., Hossain, M.I. y Kashem, M.A. 2014. Salinity (NaCl) tolerance of four vegetable crops during germination and early seedling growth. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*. 3: 91-95.
- SAS institute Inc. 2004. SAS 9.1. 3 help and documentation. Cary SAS Inst Inc., :5136.
- Singh, B. y Sharma, R.A. 2017. Pyrrolizidine Alkaloids and their Biological Properties from Indian *Heliotropium* Species. *Current Bioactive Compounds*. 15: 3–18.
- Sium, A., Shawon, A., Swapan Kumar, R., Sun Hee, W., Kailas Dashrath, S. y Shohael, A.M. 2019. Effect of salinity on the morphological, physiological, and biochemical properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Bangladesh. *Open Agriculture*. 4: 361-373.
- Surwase, U.S. y Patil, S.M. 2022. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extraction of *Flaveria trinervia* Leaves. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 14: 701–704.
- Taha, A. y Alsayed, H. 2000. Brine Shrimp Bioassay of Ethanol Extracts of *Sesuvium verrucosum*, *Salsola baryosma* and *Zygophyllum quatarense* Medicinal Plants from Bahrain. *Phytotherapy Research*. 14: 48–50.
- Tarchoun, N., Saadaoui, W., Mezghani, N., Pavli, O.I., Falleh, H. y Petropoulos, S.A. 2022. The effects of salt stress on germination, seedling growth and biochemical responses of tunisian squash (*Cucurbita maxima* Duchesne) germplasm. *Plants*. 11: 800.
- Terrazas-Rueda, J.M. 2019. Aprovechamiento del suelo salino: agricultura salina y recuperación de suelos. *Apthapi*. 5: 1539-1563.
- Tiquia, S.M. 2010. Reduction of compost phytotoxicity during the process of decomposition. *Chemosphere*. 79: 506–512.
- Tuszynska, A., Wilinska, A. y Czerwionka, K. 2021. Phosphorus and nitrogen forms in liquid fraction of digestates from agricultural biogas plants. *Environmental Technology*. 42: 3942-3954.
- Urriola, L., Castillo, K.M. y Vergara, M.D. 2021. Evaluación de la fitotoxicidad de abonos orgánicos comerciales usando semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Semilla Del Este*. 1: 1-11.
- Valentinuzzi, F., Cavani, L., Porfido, C., Terzano, R., Pii, Y., Cesco, S., Marzadori, C. y Mimmo, T. 2020. The fertilising potential of manure-based biogas fermentation residues: pelleted vs. liquid digestate. *Heliyon*. 6: e03325.
- Varnero, M.M.T., Rojas, A.C. y Orellana, R.R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de la Ciencias del Suelo y Nutrición Vegetal*. 7: 28-37.
- Yu, L., Qiao, X., Duan, H., Zhang, Z., Gong, L., Li, X., Lu, J. y Li, X. 2022. Life cycle assessment of liquid digestate application strategies for rice agri-food chain in “Zero-waste City”. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 1: 1-13.
- Zhang, H., Irving, L.J., McGill, C., Matthew, C., Zhou, D. y Kemp, P. 2010. The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Annals of Botany*. 106: 1027–1035.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. y Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*. 1: 54–57.

Comprehensive characterization of the overlooked residue generated during roselle calyxes brewing with potential use as functional ingredient

Caracterización integral del residuo generado durante la decocción de cálices de jamaica con uso potencial como ingrediente funcional

Jesús Eduardo Serna-Tenorio¹, Ana María Sotelo-González², Rosalía Reynoso-Camacho², Miriam Aracely Anaya-Loyola¹, and Iza Fernanda Pérez-Ramírez*

¹ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias s/n, Juriquilla 76230, Querétaro.

² Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Las Campanas, Querétaro 76010, Querétaro.

ABSTRACT

A significant quantity *Hibiscus sabdariffa* L. calyxes are generated as by-products during the decoction process commonly used for roselle beverage preparation. We conducted an extensive characterization of polyphenols, organic acids, and antioxidant potential in roselle calyxes, decoction, and their by-product. Roselle calyxes were found to be a rich source of diverse polyphenols, including delphinidin sambubioside, caffeoylquinic acids, hibiscus acid, and citric acid as major components. Importantly, we extracted a significant proportion of these bioactive compounds during the decoction process, resulting in a polyphenol-rich beverage. The used calyxes (decoction by-product) retained from 23 % to 140 % of the extractable polyphenols and organic acids found in roselle calyxes. Additionally, due to the leaching of hydrophobic components like soluble dietary fiber and extractable polyphenols and organic acids, the roselle by-products were enriched with non-extractable constituents attached to dietary fiber (126 % - 272 %). Therefore, roselle calyxes and their decoction by-products emerge as promising sources of polyphenols with the potential for use in dietary supplements, alongside the commonly consumed roselle decoction.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L.; by-product; bioactive compounds; antioxidant capacity; nutraceutical value.

RESUMEN

Durante el proceso de decocción comúnmente utilizado en la preparación de la bebida de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), se genera una cantidad significativa de cálices de esta planta como subproducto. En este estudio, realizamos una exhaustiva caracterización de polifenoles, ácidos orgánicos y el potencial antioxidante en los cálices de jamaica, la decocción y su subproducto. Los cálices de jamaica son una fuente rica en diversos polifenoles, incluyendo delfinidina sambubiosido, ácidos cafeoilquinínicos, ácido hibisco y ácido cítrico como principales componentes. De manera importante, una proporción significativa de estos compuestos bioactivos se extrajo durante el proceso de decocción, lo que resultó en

una bebida rica en polifenoles. Los cálices utilizados (subproducto de la decocción) retuvieron entre el 23 % y el 140 % de los polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles totales de la jamaica. Además, dicho subproducto fue enriquecido con componentes no extraíbles unidos a la fibra dietaria (126 % - 272 %) debido a la lixiviación de componentes hidrofóbicos, tales como fibra dietaria soluble y polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles. Por lo tanto, los cálices de jamaica y sus subproductos de decocción emergen como fuentes prometedoras de polifenoles con potencial para su uso en suplementos dietéticos, junto con la comúnmente consumida decocción de jamaica.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa* L.; subproducto; compuestos bioactivos; capacidad antioxidante; valor nutracéutico.

INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa L., commonly known as roselle, is cultivated in numerous tropic and subtropic countries. The calyxes are the main part consumed of this plant, which are consumed fresh, pickled, or dried depending on the local gastronomy. Nevertheless, a common use of roselle calyxes is for the elaboration of infusions or decoctions, leading to a refreshing deep red colored soft drink with a soothing taste (Jamrozik *et al.*, 2022) rich in anthocyanins and non-pigmented flavonoids, phenolic acids, and organic acids (Sapian *et al.*, 2023). While roselle calyxes have been recognized for their nutraceutical value, a substantial environmental issue arises during their preparation. The significant amount of herb material used for infusions or decoctions is often discarded, contributing to environmental waste. These wastes, as recent studies suggest (Debnath *et al.*, 2021), may contain valuable compounds.

Sáyago-Ayerdi *et al.* (2014) reported that roselle residues are rich in dietary fiber with considerable antioxidant capacity. Interestingly, the polyphenols found in roselle decoction by-product were found to be highly bioaccessible in the gastrointestinal tract (Mercado-Mercado *et al.*, 2015).

*Author for correspondence: Iza Fernanda Pérez-Ramírez
 e-mail: iza.perez@uaq.mx.

Received: September 11, 2023

Accepted: November 23, 2023

Published: December 08, 2023

In a previous study carried out by our research group, we demonstrated that the decoction process increased the porosity in used roselle calyxes (Amaya-Cruz *et al.*, 2018).

Therefore, in our study we hypothesized that the modifications of the chemical structure and composition during roselle decoction leads to the leaching of extractable polyphenols and organic acids, which are found as free components within the food matrix; whereas the non-extractable polyphenols and organic acids, which are bound to the dietary fiber of the food matrix can either be released and found as extractable components, or can be concentrated and found in higher amount. Interestingly, these non-extractable components are mainly found in fruit, vegetable, and herbs by-products (Ding *et al.*, 2020) and have been reported to exert numerous health beneficial effects.

In this regard, we previously demonstrated that roselle decoction by-product exert similar anti-obesity, hypoglycemic, and hypolipidemic effects than roselle calyx (Amaya-Cruz *et al.*, 2019), which could be associated with the high extractable polyphenol content in roselle calyx, and the high non-extractable polyphenol content in roselle by-product. Even though in our study a qualitative polyphenol profile was carried out, we recognized that the quantification of the potential bioactive compounds is essential. Therefore, in our study, we aimed not only to identify, but also quantify, the constituents of the extractable and non-extractable fractions of roselle calyx and its decoction by-product and to determine their impact on their antioxidant capacity, as well as the polyphenol and organic acid composition of roselle decoction through high-resolution mass spectrometry.

MATERIAL AND METHODS

Roselle calyx, decoction, and by-product

Dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes were obtained from local producers from Guerrero, Mexico. Calyxes were disinfected with 1 % Nobac citrus 373 solution for 10 min by immersion, drained, and then dried at 45 °C for 48 h in a forced circulation oven (BF 400, Binder, Tuttlingen, Germany). Subsequently, 100 g of dried and disinfected roselle calyxes were subjected to a decoction process with 1 L of boiling water for 15 min as reported by Amaya-Cruz *et al.* (2019). The used calyxes (by-product) were separated from the liquid (decoction) by decantation. The roselle by-product was dried as previously described, then ground to a size particle < 420 µm. The roselle calyx, decoction, and by-product were stored at -20 °C until they were further analyzed. Roselle decoction was thawed at 4 °C for 24 h and subsequently brought to room temperature before undergoing chemical analyses, while roselle calyx and by-product were directly analyzed. The decoction process was performed in triplicate. Within each decoction replicate, the by-product and the calyx were both analyzed in triplicate for each assay.

Polyphenols extraction from roselle calyx and by-product

The roselle decoction was directly utilized to determine the polyphenol composition. The roselle calyx and by-product

were subjected to a sequential polyphenol extraction with organic solvents as reported by Hassan *et al.* (2011). Briefly, 500 mg of each sample were extracted with 5 mL of 50:50 (v/v) methanol:water, adjusted to pH 2 using hydrochloric acid. The extraction was performed at room temperature for 60 min under continuous stirring. Then, samples were centrifuged (1500 x g for 10 min). Supernatants were recovered and the residue was further extracted with 5 mL of 70:30 (v/v) acetone:water as previously described. The combination of these supernatants formed the extractable polyphenol (EPP) fraction, utilized to quantify extractable polyphenols, flavonoids, anthocyanins, and proanthocyanidins. The residues were dried at 45 °C for 25 h, forming the non-extractable polyphenol (NEPP) fraction utilized to quantify hydrolysable polyphenols (HPP) and non-extractable proanthocyanidins (NEPA).

Total and extractable phenolic compounds

The polyphenol content was determined as reported by Singleton *et al.* (1999) with minor modifications. Briefly, 10 µL of each sample were mixed with 25 µL of 1 N Folin Ciocalteu, 125 µL of a 20 % (w/v) aqueous solution of sodium carbonate, and 40 µL of distilled water. The reactions were incubated for 30 min under darkness. Then, absorbances were measured at 765 nm. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents/mL of roselle decoction or mg of gallic acid equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Total and extractable flavonoid content

The flavonoid content was determined as reported by Oomah *et al.* (2005) with minor modifications. Briefly, 100 µL of each sample were mixed with 20 µL of a 1 mg/mL methanolic solution of 2-aminoethyl-diphenylborate, and 130 µL of distilled water. Then, absorbances were immediately measured at 404 nm. The results were expressed as mg of rutin equivalents/mL of roselle decoction or mg of rutin equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Total and extractable anthocyanin content

The anthocyanin content was determined as described by Giusti and Wrolstad (2001) with minor modifications. Briefly, 50 µL of each sample were mixed with 175 µL of each buffer: 0.25 M potassium chloride at pH 1 or 0.40 M sodium acetate at pH 4.5. Then, absorbances were immediately measured at 510 and 700 nm. The results were expressed as mg of cyanidin 3-O-glycoside equivalents/mL of roselle decoction or mg of cyanidin 3-O-glycoside equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Extractable proanthocyanidins

The extractable proanthocyanidins (EPA) content was determined as reported by Zurita *et al.* (2012). Briefly, 500 µL of each sample were mixed with 4.5 mL of a 95:5 (v/v) buthanol:hydrochloric acid solution containing 0.07 g/L of iron chloride. The reactions were incubated in a boiling water bath for 1 h. Then, samples were centrifuged at 1500 x g for

10 min and supernatants were recovered. Absorbances were measured at 450 and 550 nm. The results were expressed as mg of proanthocyanidin equivalents/mL of roselle decoction or mg of proanthocyanidin equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Hydrolysable polyphenols content

A sequential alkaline and acid hydrolysis was carried out as reported by Quatrin *et al.* (2019). The NEPP residues were incubated with 5 mL of 10 M sodium hydroxide and 12 mL of distilled water under continuous stirring for 16 h. Then, their pH was adjusted to 2 - 3 with 6 M hydrochloric acid. Samples were centrifuged at 2000 x g for 10 min and supernatants were recovered. Afterwards, the residues were re-extracted with 5 mL of distilled water as previously described. The supernatants were mixed to quantify polyphenols as described. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents/mL of roselle decoction or mg of gallic acid equivalents/g of roselle calyx or by-product, reflecting the alkaline HPP content. Then, the residue obtained during the alkaline hydrolyses was subjected to acid hydrolysis with 2.5 mL of hydrochloric acid. Samples were incubated at 85 °C for 30 min. Then, their pH was adjusted to 2 - 3 with 10 M sodium hydroxide. Afterwards, the residues were re-extracted with 5 mL of distilled water as previously described. The supernatants were mixed to quantify polyphenols as described. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents/mL of roselle decoction or mg of gallic acid equivalents/g of roselle calyx or by-product, reflecting the acid HPP content.

Non-extractable proanthocyanidins content

The NEPA content was determined as reported by Zurita *et al.* (2012) in the NEPP residue as previously described. The results were expressed as mg of proanthocyanidin equivalents/mL of roselle decoction or mg of proanthocyanidin equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Polyphenol profile by UPLC-ESI-QToF MS

The roselle decoction was filtered using a syringe filter with PTFE membrane (13 mm, 0.2 µm). The EPP and HPP extracts obtained from the roselle calyx and by-product were vacuum-dried using a Speedvac system (Savant, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), re-suspended in 200 µL of mobile phase, and subsequently filtered. The polyphenol profile was assessed in an Ultra-Performance Liquid Chromatograph coupled to a high-resolution Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometer (UPLC-QToF MSE, Vion, Waters Co., MA, USA). The autosampler was maintained at 4 °C. The chromatographic separation was carried out with 1 µL of each sample injected into a C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm, BEH Acquity, Waters Co.) at 35 °C. The mobile phase was constituted by (a) water with 1 % formic acid and (B) acetonitrile with 1 % formic acid using the gradient conditions throughout 17 min as reported by Reynoso-Camacho *et al.* (2021). An atmospheric pressure electrospray ionization (ESI) source was used at negative and positive mode at 120 °C using nitrogen as desolvation gas

(800 L/h at 450 °C) and as cone gas (50 L/h). The mass spectra were acquired at 100-1200 m/z at low (6 V) and high (15-45 V) collision energy. Data were mass corrected during acquisition using a 50 pg/mL leucine enkephalin solution at 10 µL/min.

Polyphenol identification was carried out by comparison of the experimental mass with the theoretical mass according to their molecular formula, with a mass error <10 ppm cut-off and by the analysis of the fragmentation pattern. For compounds for which a standard was available, quantification was carried out using its corresponding calibration curve. In cases where a commercial standard was unavailable, quantification was conducted using the most similar standard available. The results were expressed as mg/mL of roselle decoction or mg/g of roselle calyx or by-product.

Antioxidant capacity

The antioxidant capacity was determined in the roselle decoction, as well as in the EPP and HPP fractions of the roselle calyx and by-product, using three widely recognized methods. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay was performed following the procedure outlined by Fukumoto and Mazza (2000). The 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assay was conducted according to the method described by Re *et al.* (1999). The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was carried out as reported by Firuzi *et al.* (2005). The results were expressed as mmol of Trolox equivalents/mL of roselle decoction or mmol of Trolox equivalents/g of roselle calyx or by-product.

Statistical analysis

Results are presented as mean values ± standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by means comparison by Tukey's test ($p < 0.05$), using the JMP software (v14.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Traditional medicine commonly advocates the preparation of orally suitable beverages, primarily infusions and decoctions, to extract bioactive compounds from various botanical sources (Jaiswal *et al.*, 2016). These processes rely on hot water extraction of hydrophilic components such as polyphenols and organic acids found in roselle calyxes. In a beverage like roselle decoction, polyphenols are typically measured as a whole entity, either via spectrophotometry or mass spectrometry techniques. However, in complex matrices like roselle calyxes and by-products, it is crucial to independently analyze the content and composition of extractable and non-extractable components. The former refers to components soluble in the extraction solvents, while the latter can correspond to polymeric constituents or monomeric components bound to macromolecules (Báez-García *et al.*, 2023).

In this study, we conducted a comprehensive analysis of the polyphenols, organic acids, and antioxidant potential of roselle calyxes, decoction, and its by-product. We quantified the total, extractable, and non-extractable polyphenols using

spectrophotometric techniques (Table 1). Subsequently, we employed a high-resolution UPLC-QToF MS^E system for an exhaustive identification of antioxidant compounds, with a primary focus on polyphenols and organic acids (Tables 2 - 4), which are major constituents of roselle (Sapian *et al.*, 2023). Finally, the antioxidant capacity of each fraction was assessed by three spectrophotometric techniques that assess different mechanisms (Table 5).

Total polyphenol content of roselle calyx decoction

As shown in Table 1, the roselle decoction exhibits a mean polyphenol content of 111 mg/100 mL, significantly higher than other herb-based beverages (Rothwell *et al.*, 2013). It is worth noting that the proanthocyanidin content in roselle decoction is 4.4 times higher than its anthocyanin content, despite the latter being traditionally associated with its health benefits. Commonly consumed polyphenol-rich beverages, such as *Camellia sinensis* (tea) infusion and coffee, typically contain a mean total polyphenol content ranging from 62 to 105 mg/100 mL (Rothwell *et al.*, 2013). This positions roselle decoction as a competitive antioxidant beverage.

Total extractable and non-extractable polyphenol content of roselle calyx and its decoction by-product

As the global demand for flavorful herb-based beverages grows, there is a concurrent increase in waste generated from the decoction and infusion processes (Debnath *et al.*, 2021). As shown in Table 1, used roselle calyxes (decoction

by-product) displayed a lower content of extractable polyphenols (1.7-fold) compared to roselle calyxes before the decoction process, attributed to the release of these hydrophilic constituents into the decoction (beverage). This trend was observed in most of the extractable polyphenols identified in used roselle calyxes (Table 2). Notably, the antioxidant capacity assessed by ABTS and DPPH scavenging assays remained similar between roselle calyxes and their by-product, while the FRAP capacity decreased significantly (1.4 - fold; Table 5).

The release of hydrophilic constituents into the decoction led to the concentration of non-extractable constituents in the roselle decoction by-product, resulting in a higher content of both acid and alkali hydrolysable polyphenols (2.3- and 1.3-fold; Table 1) as comparison to the calyx before the decoction process. These hydrolysable polyphenols include low-molecular-weight polyphenols covalently bound to the polysaccharide constituents of dietary fiber through covalent bonds, hydrogen bonds, and/or hydrophobic interactions (Báez-García *et al.*, 2023).

Identification and quantification of polyphenols and organic acids in roselle calyx, decoction, and its by-product

Delphinidin sambubioside emerged as the major anthocyanin identified in roselle calyxes, decoction, and its by-product. The MS^E spectra obtained for this component are depicted in Figure 1, revealing a cation radical ([M]⁺) with a m/z of 597

Table 1. Total, extractable, and non-extractable polyphenol content of roselle decoction, calyx, and by-product.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales, extraíbles y no extraíbles de decocción, calix y subproducto de jamaica.

Polyphenols	Decoction	Calyx	By-product
Polyphenols			
Total content (mg GAE/mL)	1.11 ± 0.05		
Extractable fraction (mg GAE/g)		25.05 ± 0.98 ^a	14.82 ± 0.23 ^b
Acid hydrolysable fraction (mg GAE/g)		5.71 ± 0.20 ^b	13.14 ± 1.10 ^a
Alkaline hydrolysable fraction (mg GAE/g)		8.13 ± 0.59 ^b	10.61 ± 0.95 ^a
Flavonoids			
Total content (mg RE/mL)	0.22 ± 0.02		
Extractable fraction (mg RE/g)		10.87 ± 0.41 ^a	7.91 ± 0.10 ^b
Anthocyanins			
Total content (mg C3GE/mL)	0.13 ± 0.00		
Extractable fraction (mg C3GE/g)		2.24 ± 0.07 ^a	1.29 ± 0.10 ^b
Proanthocyanidins			
Total content (mg CE/mL)	0.57 ± 0.03		
Extractable fraction (mg CA/g)		1.54 ± 0.14 ^a	0.87 ± 0.03 ^b
Non-extractable fraction (mg PA/g)		2.41 ± 0.10 ^a	2.60 ± 0.02 ^a

Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences. GAE: gallic acid equivalents; RE: rutin equivalents; C3GE: cyanidin 3-O-glucoside equivalents; CE: (+)-catechin equivalents; PA: proanthocyanidin equivalents.

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). GAE: equivalentes de ácido gálico; RE: equivalentes de rutina; C3GE: equivalentes de cianidina 3-O-glucósido; CE: equivalentes de (+)-catequina; PA: equivalentes de proantocianidina.

Table 2. Polyphenol profile of roselle decoction by UPLC-ESI-QToF MS^E.**Tabla 2.** Perfil de polifenoles de decocción de jamaica por UPLC-ESI-QToF MS^E.

Compound	Rt (min)	Molecular formula	Expected mass (Da)	Observed mass (Da)	Error (ppm)	Adduct	Fragments	Content (mg/mL)
Anthocyanins								
Delphinidin sambubioside	3.59	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₆	597.1456	597.1436	-3.2458	[M] ⁺	303.05903	10.95 ± 0.02
Delphinidin hexoside	3.68	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1033	465.1071	8.1315	[M] ⁺	303.08267	0.02 ± 0.00
Flavonols								
Kaempferol aldo pentosyl-hexoside	4.20	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	580.1428	580.1432	0.7137	[M-H] ⁻	284.03284	0.19 ± 0.01
Quercetin aldo pentosyl-rutinoside	6.81	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	742.1956	742.1957	0.0777	[M-H] ⁻	300.02781, 178.99754, 151.00338	0.01 ± 0.00
Myricetin hexoside	7.00	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0904	480.0912	1.7001	[M-H] ⁻	316.02261, 178.99803, 151.00300	0.04 ± 0.01
Kaempferol rhamnosyl-hexoside-rhamnoside	8.07	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	740.2164	740.2165	0.1643	[M-H] ⁻	284.03273	0.01 ± 0.00
Quercetin rutinoside*	8.70	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.1534	610.1532	-0.2614	[M-H] ⁻	300.02711, 178.99815, 151.00322, 107.01334	0.11 ± 0.00
Quercetin hexoside	9.14	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955	464.0959	0.9470	[M-H] ⁻	300.02711, 178.99800, 151.00321, 107.01259	0.08 ± 0.01
Kaempferol hexoside-rhamnoside	10.74	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.1585	594.1581	-0.6093	[M-H] ⁻	285.0397	0.02 ± 0.00
Myricetin	11.07	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.0376	318.0378	0.7452	[M-H] ⁻	179.03454, 151.00331, 137.02392	0.01 ± 0.01
Quercetin*	11.40	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.0427	302.0427	0.1508	[M-H] ⁻	178.99784, 151.00334, 107.01267	0.02 ± 0.02
Hydroxybenzoic acids								
Gallic acid*	3.01	C ₇ H ₆ O ₅	170.0215	170.0213	-1.3736	[M-H] ⁻	125.02403	0.01 ± 0.00
Dihydroxybenzoic acid hexoside	3.20	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.0794	316.0795	0.1541	[M-H] ⁻	153.01887, 136.99077, 109.02902	1.51 ± 0.25
Vanillic acid*	3.24	C ₈ H ₈ O ₄	168.0423	168.0420	-1.8337	[M-H] ⁻	136.99077, 109.02902	0.03 ± 0.00
Galloylquinic acid isomer I	3.28	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	344.0743	344.0748	1.1862	[M-H] ⁻	191.05583, 169.05030	0.01 ± 0.00
3,4-Dihydroxybenzoic acid*	3.37	C ₇ H ₆ O ₄	154.0266	154.0266	0.0096	[M-H] ⁻	137.02418, 109.02925	0.04 ± 0.00
Hydroxybenzoic acid isomer I	3.96	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317	138.0317	0.1860	[M-H] ⁻	No fragments	0.34 ± 0.02
Dihydroxybenzoic acid isomer II	4.10	C ₇ H ₆ O ₄	154.0266	154.0266	-0.1822	[M-H] ⁻	136.86270, 109.02951	0.02 ± 0.00
Methylgallic acid	4.47	C ₈ H ₈ O ₅	184.0372	184.0372	0.1824	[M-H] ⁻	169.01423, 139.04017, 125.02445	0.03 ± 0.02
Hydroxybenzoic acid isomer II	8.91	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317	138.0316	-0.3855	[M-H] ⁻	No fragments	0.06 ± 0.00
Hydroxycinnamic acids								
Caffeoylquinic acid isomer I	3.46	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951	354.0953	0.6817	[M-H] ⁻	191.05586, 179.03485, 135.04501	3.90 ± 0.19
Coumaroylquinic acid isomer I	3.98	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.1002	338.1007	1.4770	[M-H] ⁻	191.05603, 163.04009, 119.05021	0.63 ± 0.02
Caffeic acid hexoside	4.01	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.0951	342.0956	1.6240	[M-H] ⁻	178.99889, 135.01643	0.04 ± 0.00
Caffeoylquinic acid isomer II	4.11	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951	354.0956	1.5046	[M-H] ⁻	191.05586, 179.05521, 135.04492	1.26 ± 0.17
Chlorogenic acid*	4.28	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951	354.0958	1.9330	[M-H] ⁻	191.03346, 179.03518, 135.04523	2.41 ± 0.02
Ferulic acid hexoside	4.71	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	356.1107	356.1112	1.4254	[M-H] ⁻	193.05060, 178.02642, 135.04506	0.01 ± 0.00
Caffeic acid*	4.72	C ₉ H ₈ O ₄	180.0423	180.0424	0.8791	[M-H] ⁻	135.04525	0.07 ± 0.00
Feruloylquinic acid isomer I	4.89	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1116	2.3544	[M-H] ⁻	192.99567, 134.03622	0.12 ± 0.00
Coumaroylquinic acid isomer II	5.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.1002	338.1008	1.9346	[M-H] ⁻	191.03403, 163.04014, 119.05039	0.78 ± 0.01
Feruloylquinic acid isomer II	6.28	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1114	1.8727	[M-H] ⁻	192.97484, 179.10743, 134.03476	0.07 ± 0.00
<i>p</i> -Coumaric acid*	6.37	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	164.0474	0.2458	[M-H] ⁻	119.05004	0.01 ± 0.00
Feruloylquinic acid isomer III	7.23	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1112	1.3841	[M-H] ⁻	191.05562, 179.03476, 135.04494	0.10 ± 0.00
Organic acids								
Citric acid*	1.38	C ₆ H ₈ O ₇	192.0270	192.0265	-2.7462	[M-H] ⁻	111.00859	2.80 ± 0.06
Hibiscus acid	0.61	C ₆ H ₈ O ₈	208.0219	208.0215	-1.9499	[M-H] ⁻	189.00344, 127.00330	14.08 ± 0.01
Hydroxycitric acid	1.28	C ₆ H ₈ O ₈	208.0219	208.0216	-1.3813	[M-H] ⁻	189.00371, 127.00347	0.31 ± 0.04
Quinic acid	0.59	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.0634	192.0630	-1.9364	[M-H] ⁻	127.00344	0.43 ± 0.01

*Identification confirmed with commercial standards.

*Identificación confirmada con estándares comerciales.

Table 3. Extractable polyphenols and organic acid profiles of roselle calyx and by-product by UPLC-ESI-QToF MS^E.**Tabla 3.** Perfil de polifenoles y de ácidos orgánicos extraíbles de calix y subproducto de jamaica por UPLC-ESI-QToF MS^E.

Compound	Rt (min)	Molecular formula	Expected mass (Da)	Observed mass (Da)	Error (ppm)	Adduct	Fragments	Content (mg/g)	
								Calyx	By-product
Anthocyanins									
Delphinidin sambubioside	3.59	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₆	597.1456	597.1436	-3.2458	[M] ⁺	303.05903	1.32 ± 0.14 ^a	0.35 ± 0.03 ^b
Delphinidin hexoside	3.68	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1033	465.1071	8.1315	[M] ⁺	303.08267	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
Flavonols									
Kaempferol aldo pentosyl-hexoside	4.20	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	580.1428	580.1432	0.7137	[M-H] ⁻	284.03284	0.42 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.04 ^b
Myricetin rutinoside	6.78	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	626.1482	-0.1203	[M-H] ⁻	316.02251, 178.99842, 151.00369	0.05 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^b
Quercetin aldo pentosyl-rutinoside	6.81	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	742.1956	742.1957	0.0777	[M-H] ⁻	300.02781, 178.99754, 151.00338	0.03 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
Myricetin hexoside	7.00	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0904	480.0912	1.7001	[M-H] ⁻	316.02261, 178.99803, 151.00300	0.17 ± 0.04 ^a	0.08 ± 0.00 ^b
Quercetin rutinoside	8.70	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.1534	610.1532	-0.2614	[M-H] ⁻	300.02711, 178.99815, 151.00322, 107.01334	0.56 ± 0.12 ^a	0.33 ± 0.07 ^b
Quercetin hexoside	9.14	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955	464.0959	0.9470	[M-H] ⁻	300.02711, 178.99800, 151.00321, 107.01259	0.44 ± 0.10 ^a	0.20 ± 0.05 ^b
Kaempferol hexoside-rhamnoside	10.74	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.1585	594.1581	-0.6093	[M-H] ⁻	285.0397	0.07 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^a
Myricetin	11.07	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.0376	318.0378	0.7452	[M-H] ⁻	179.03454, 151.00331, 137.02392	0.17 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.02 ^a
Quercetin*	11.40	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.0427	302.0427	0.1508	[M-H] ⁻	178.99784, 151.00334, 107.01267	0.49 ± 0.02	0.69 ± 0.08 ^a
Hydroxybenzoic acids									
Gallic acid*	3.01	C ₇ H ₆ O ₅	170.0215	170.0213	-1.3736	[M-H] ⁻	125.02403	0.44 ± 0.03 ^a	0.34 ± 0.02 ^b
Dihydroxybenzoic acid hexoside	3.20	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.0794	316.0795	0.1541	[M-H] ⁻	153.01887, 136.99077, 109.02902	6.93 ± 0.44 ^a	4.83 ± 0.27 ^b
Vanillic acid	3.24	C ₈ H ₈ O ₄	168.0423	168.0420	-1.8337	[M-H] ⁻	136.99077, 109.02902	0.12 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.00 ^a
3,4-Dihydroxybenzoic acid*	3.37	C ₇ H ₆ O ₄	154.0266	154.0266	0.0096	[M-H] ⁻	137.02418, 109.02925	0.42 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.00 ^b
Hydroxybenzoic acid isomer I	3.96	C ₇ H ₆ O ₃	138.0317	138.0317	0.1860	[M-H] ⁻	No fragments	2.43 ± 0.18 ^a	1.78 ± 0.00 ^b
Dihydroxybenzoic acid isomer II	4.10	C ₇ H ₆ O ₄	154.0266	154.0266	-0.1822	[M-H] ⁻	136.86270, 109.02951	0.23 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^b
Methylgallic acid	4.47	C ₈ H ₈ O ₅	184.0372	184.0372	0.1824	[M-H] ⁻	169.01423, 139.04017, 125.02445	0.27 ± 0.05 ^a	0.09 ± 0.00 ^b
Galloylquinic acid isomer II	7.67	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	344.0743	344.0746	0.6374	[M-H] ⁻	191.05583, 169.05030	0.81 ± 0.18 ^a	ND
Galloylquinic acid isomer III	7.96	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	344.0743	344.0747	0.8987	[M-H] ⁻	190.99818, 169.98481	0.74 ± 0.18 ^a	ND
Hydroxycinnamic acids									
Caffeoylquinic acid isomer I	3.46	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951	354.0953	0.6817	[M-H] ⁻	191.05586, 179.03485, 135.04501	15.22 ± 1.29 ^a	13.74 ± 0.10 ^a
Coumaroylquinic acid isomer I	3.98	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.1002	338.1007	1.4770	[M-H] ⁻	191.05603, 163.04009, 119.05021	1.60 ± 0.20 ^a	1.52 ± 0.01 ^a
Caffeic acid hexoside	4.01	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.0951	342.0956	1.6240	[M-H] ⁻	178.99889, 135.01643	0.16 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.00 ^b
Chlorogenic acid*	4.28	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0951	354.0958	1.9330	[M-H] ⁻	191.03346, 179.03518, 135.04523	10.86 ± 1.27 ^a	8.69 ± 0.19 ^a
Caffeic acid*	4.72	C ₉ H ₈ O ₄	180.0423	180.0424	0.8791	[M-H] ⁻	135.04525	0.59 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.00 ^b
Feruloylquinic acid isomer I	4.89	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1116	2.3544	[M-H] ⁻	192.99567, 134.03622	1.03 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.02 ^a
Coumaroylquinic acid isomer II	5.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.1002	338.1008	1.9346	[M-H] ⁻	191.03403, 163.04014, 119.05039	3.24 ± 0.51 ^a	2.06 ± 0.01 ^b
Feruloylquinic acid isomer II	6.28	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1114	1.8727	[M-H] ⁻	192.97484, 179.10743, 134.03476	1.01 ± 0.16 ^a	0.73 ± 0.02 ^b
<i>p</i> -Coumaric acid*	6.37	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	164.0474	0.2458	[M-H] ⁻	119.05004	0.08 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.00 ^a
Feruloylquinic acid isomer III	7.23	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.1107	368.1112	1.3841	[M-H] ⁻	191.05562, 179.03476, 135.04494	1.75 ± 0.28 ^a	0.86 ± 0.01 ^b
Ferulic acid*	10.74	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.0579	194.0572	-3.8475	[M-H] ⁻	178.02718, 134.86543	0.04 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^a
Organic acids									
Citric acid*	1.38	C ₆ H ₈ O ₇	192.0270	192.0265	-2.7462	[M-H] ⁻	111.00859	11.17 ± 0.82 ^a	11.64 ± 0.88 ^a
Hibiscus acid	0.61	C ₆ H ₈ O ₈	208.0219	208.0215	-1.9499	[M-H] ⁻	189.00344, 127.00330	37.57 ± 2.88 ^a	33.38 ± 2.27 ^a
Hydroxycitric acid	1.28	C ₆ H ₈ O ₈	208.0219	208.0216	-1.3813	[M-H] ⁻	189.00371, 127.00347	1.08 ± 0.21 ^a	ND
Quinic acid	0.59	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.0634	192.0630	-1.9364	[M-H] ⁻	127.00344	1.62 ± 0.68 ^a	1.00 ± 0.35 ^b

Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences. *Identification confirmed with commercial standards. ND: not detected.Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). *Identificación confirmada con estándares comerciales. ND: no detectado.

Table 4. Non-extractable polyphenols and organic acid profiles of roselle calyx and by-product by UPLC-ESI-QToF MS^F.**Tabla 4.** Perfil de polifenoles y de ácidos orgánicos no extraíbles de caliz y subproducto de jamaica por UPLC-ESI-QToF MS^F.

Compound	Rt (min)	Molecular formula	Expected mass (Da)	Observed mass (Da)	Error (ppm)	Adduct	Fragments	Content (mg/g)	
								Calyx	By-product
ALKALINE HYDROLYSABLE POLYPHENOLS									
Hydroxybenzoic acids									
3,4-Dihydroxybenzoic acid*	3.37	C7H6O4	154.0266	154.0266	0.0096	[M-H] ⁻	137.02418, 109.02925	0.28 ± 0.02 ^b	0.62 ± 0.04 ^a
Hydroxybenzoic acid isomer I	3.96	C7H6O3	138.0317	138.0317	0.1860	[M-H] ⁻	No fragments	1.36 ± 0.00 ^b	2.63 ± 0.15 ^a
Hydroxycinnamic acids									
Ferulic acid*	10.74	C10H10O4	194.0579	194.0572	-3.8475	[M-H] ⁻	178.02718, 134.86543	ND	0.20 ± 0.01 ^a
Sinapic acid*	11.17	C11H12O5	224.0685	224.0674	-4.9933	[M-H] ⁻	208.03765	0.14 ± 0.01 ^b	0.68 ± 0.13 ^a
Organic acids									
Quinic acid	0.59	C7H12O6	192.0634	192.0630	-1.9364	[M-H] ⁻	127.00344	0.26 ± 0.02 ^b	0.72 ± 0.4 ^a
ACID HYDROLYSABLE POLYPHENOLS									
Hydroxybenzoic acids									
Dihydroxybenzoic acid hexoside	3.20	C13H16O9	316.0794	316.0795	0.1541	[M-H] ⁻	153.01887, 136.99077, 109.02902	2.09 ± 0.14 ^b	4.61 ± 0.62 ^a
Organic acids									
Citric acid*	1.38	C6H8O7	192.0270	192.0265	-2.7462	[M-H] ⁻	111.00859	ND	0.37 ± 0.01 ^a
Hibiscus acid	0.61	C6H8O8	208.0219	208.0215	-1.9499	[M-H] ⁻	189.00344, 127.00330	3.36 ± 0.56 ^b	4.25 ± 0.27 ^a
Quinic acid	0.59	C7H12O6	192.0634	192.0630	-1.9364	[M-H] ⁻	127.00344	9.47 ± 0.84 ^b	12.22 ± 1.7 ^a

Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences. *Identification confirmed with commercial standards. ND: not detected.Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). *Identificación confirmada con estándares comerciales. ND: no detectado.**Table 5.** Antioxidant capacity of roselle decoction, calyx, and by-product.**Tabla 5.** Capacidad antioxidante de decocción, caliz y subproducto de jamaica.

Antioxidant capacity	Decoction	Calyx	By-product
ABTS assay			
Total content (mmol TE/mL)	49.41 ± 0.66		
Extractable fraction (mmol TE/g)		394.60 ± 2.55 ^a	386.96 ± 6.99 ^a
Acid hydrolysable fraction (mmol TE/g)		34.32 ± 1.42 ^a	22.11 ± 1.75 ^b
Alkaline hydrolysable fraction (mmol TE/g)		185.85 ± 1.09 ^a	18.67 ± 0.31 ^b
DPPH assay			
Total content (mmol TE/mL)	2.71 ± 0.11		
Extractable fraction (mmol TE/g)		364.76 ± 25.10 ^a	382.93 ± 6.27 ^a
Acid hydrolysable fraction (mmol TE/g)		2210.41 ± 47.95 ^b	2400.05 ± 22.76 ^a
Alkaline hydrolysable fraction mmol TE/g)		558.72 ± 8.67 ^b	1886.99 ± 124.78 ^a
FRAP assay			
Total content (mmol TE/mL)	1.01 ± 0.09		
Extractable fraction (mmol TE/g)		0.23 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^b
Acid hydrolysable fraction (mmol TE/g)		0.14 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^b
Alkaline hydrolysable fraction (mmol TE/g)		0.19 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^b

Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences. TE: trolox equivalents.Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). TE: equivalentes de Trolox.

and a fragment at m/z 303 corresponding to the delphinidin aglycone after the disaccharide moiety is lost. Although delphinidin hexoside, a minor anthocyanin was also identified, our study did not detect cyanidin derivatives, possibly due to the deep red-purple color of the calyxes used, which is attributed to delphinidin derivatives. For instance, Hinojosa-Gómez *et al.* (2020) reported both delphinidin- and cyanidin-sambubioside as major anthocyanins in roselle calyxes from red cultivars. It is noteworthy that delphinidin 3-sambubioside extracted from roselle calyxes decreases hepatic steatosis in both in vivo and in vitro studies by decreasing fatty acid lipogenesis and augmenting fatty acid beta-oxidation (Long *et al.*, 2021).

Regarding non-pigmented flavonoids, previous research have identified quercetin and kaempferol aglycones and their derivatives in various roselle varieties and plant parts (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). In our study, these flavonoids were identified as minor components. Some flavones like gossypetin, hibiscitrin, sabdaretin, and hibiscetin, previously reported in roselle flowers (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014), were not detected.

In the context of phenolic acids, the major hydroxybenzoic acid was dihydrobenzoic acid hexoside, appearing at 315 m/z as a deprotonated molecular ion. A fragment at 153 m/z resulted from the loss of the hexoside moiety, while another at 109 m/z stemmed from CO₂ detachment (Figure

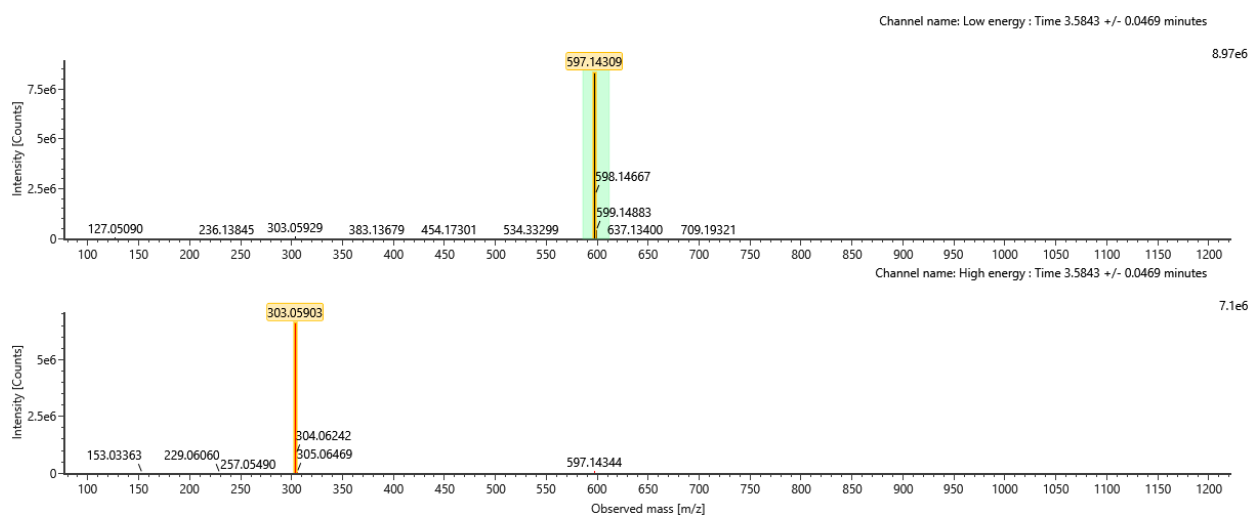


Figure 1. High-resolution mass spectra of delphinidin sambubioside. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15–45 V (high collision energy).

Figura 1. Espectro de masas de alta resolución de delphinidina sambubiosida. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15–45 V (alta energía de colisión).

2). Accordingly, protocatechuic acid has been identified as major component in roselle calyx, with a higher content as compared to other Mediterranean plants (Rababah *et al.*, 2011) and edible flowers (Trinh *et al.*, 2018). Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) and its glucoside derivative are well-known for their antioxidant and anti-inflammatory properties (Kakkar and Bais, 2014); moreover, *in silico* studies suggest that protocatechuic acid shows a better inhibitory potential of phosphoenolpyruvate carboxylase, a key enzyme involved in hepatic insulin resistance, than the anti-diabetic drug metformin (Mohanty and Bhadra, 2020).

The major hydroxycinnamic acids were caffeoylquinic acids, including chlorogenic acid, observed at 353 m/z as a deprotonated molecular ion. Fragments corresponding to quinic acid (191 m/z), caffeic acid (179 m/z), and decarboxylated caffeic acid (135 m/z) were also noted (Figures 3

and 4). Interestingly, these compounds have been reported to contribute to the flavor of roselle (Selli *et al.*, 2021) and are recognized as primary precursors for developing coffee flavor and aroma (Lin *et al.*, 2022). Coumaroylquinic acid was also found as a major phenolic acid, also identified as a deprotonated ion at 337 m/z, with fragments at 191 m/z (quinic acid), 163 m/z (coumaric acid), and 119 m/z (decarboxylated coumaric acid; Figure 5). Accordingly, chlorogenic acids have been identified as the major phenolic acid in roselle extracts, contributing with almost 18 % (Yang *et al.*, 2023), which shows high inhibitory activity against the angiotensin converting enzyme, suggesting an anti-hypertensive potential (Salem *et al.*, 2020). Conversely to our study, coumaroylquinic acids have been identified as minor components in roselle extracts (Yang *et al.*, 2023).

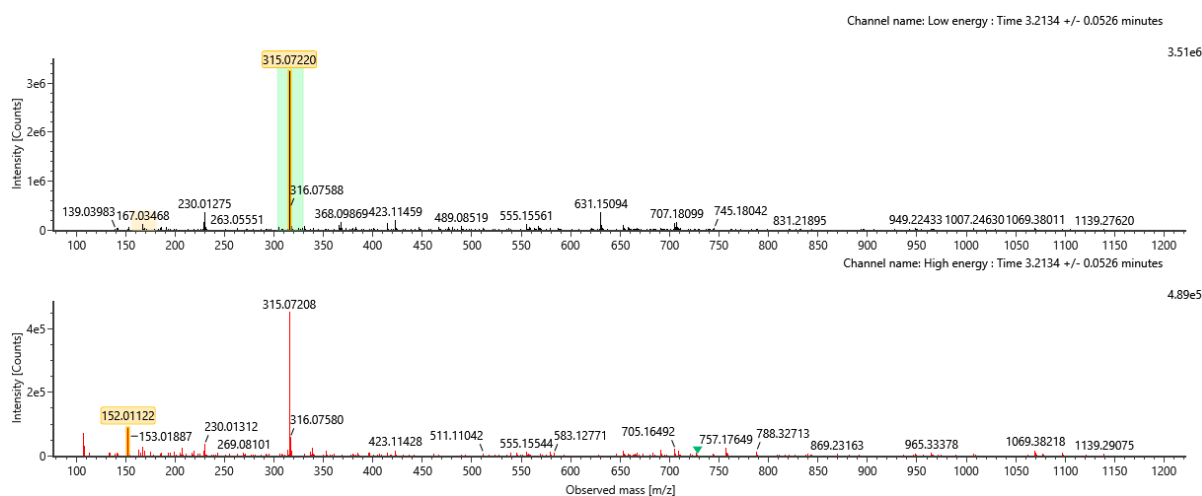


Figure 2. High-resolution mass spectra of dihydroxybenzoic acid hexoside. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15–45 V (high collision energy).

Figura 2. Espectro de masas de alta resolución de ácido dihidroxibenzoico hexósido. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15–45 V (alta energía de colisión).

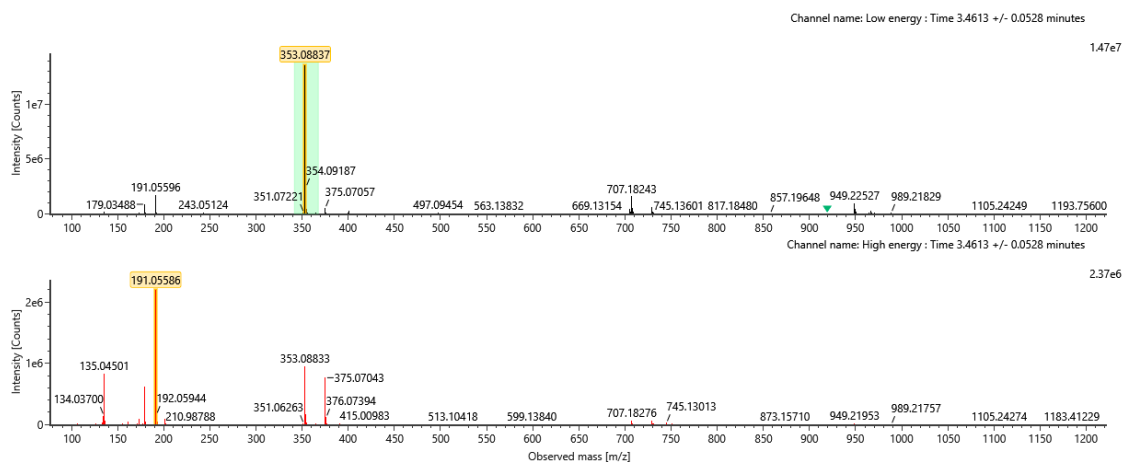


Figure 3. High-resolution mass spectra of caffeoylquinic acid isomer I. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15-45 V (high collision energy).

Figura 3. Espectro de masas de alta resolución de ácido cafeoilquínico isómero I. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15-45 V (alta energía de colisión).

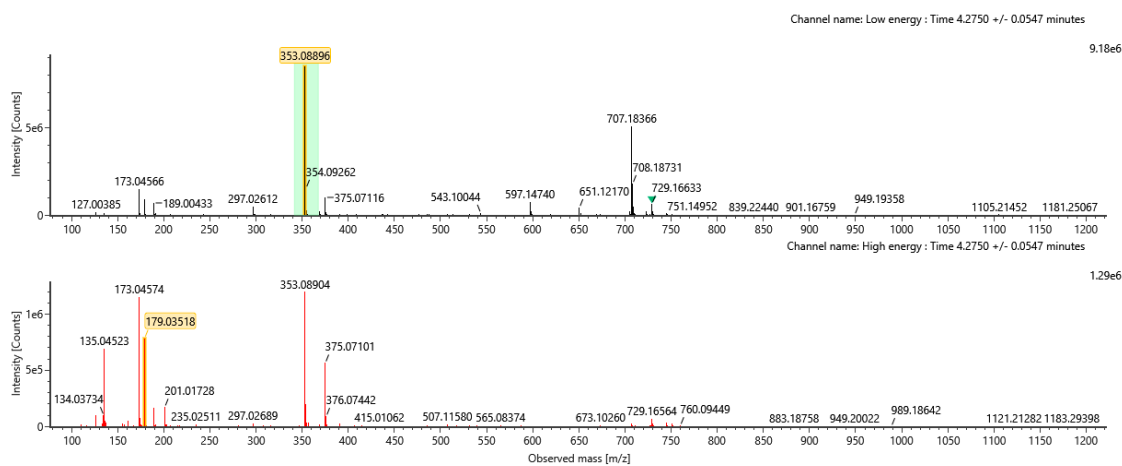


Figure 4. High-resolution mass spectra of caffeoylquinic acid isomer III (chlorogenic acid). Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15-45 V (high collision energy).

Figura 4. Espectro de masas de alta resolución de ácido cafeoilquínico isómero III (ácido clorogénico). El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15-45 V (alta energía de colisión).

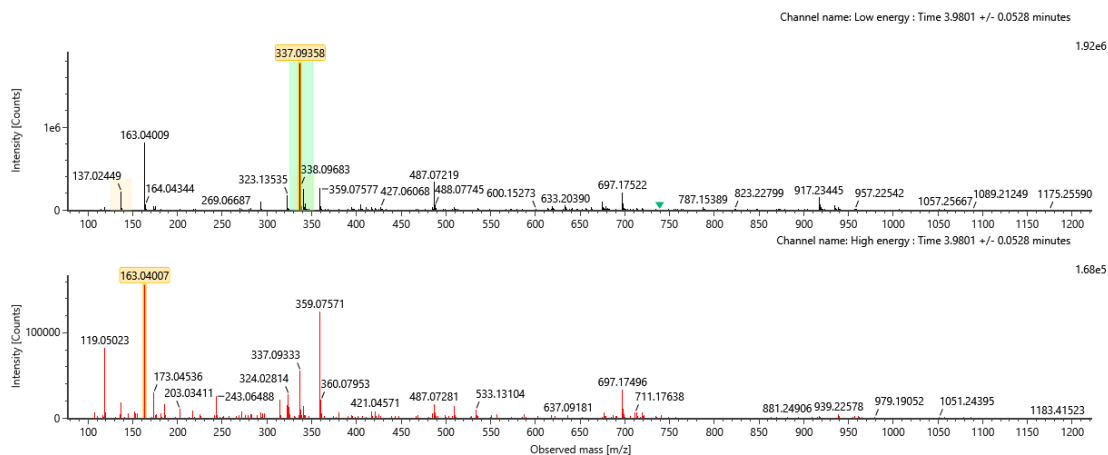


Figure 5. High-resolution mass spectra of coumaroylquinic acid isomer II. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15-45 V (high collision energy).

Figura 5. Espectro de masas de alta resolución de ácido cumaroliquínico isómero II. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15-45 V (alta energía de colisión).

Among the organic acids, hibiscus acid highlighted as the major compound, consistent with previous studies (Sapian *et al.*, 2023). This organic acid appeared in its deprotonated form ($[M-H]^-$) at 207 m/z, with fragments at 189 and 127 m/z (Figure 6). Additionally, citric and quinic acids were identified as deprotonated ions at 191 m/z with their representative characteristic fragment at 111 and 127 m/z, respectively (Figures 7 and 8). Importantly, the hibiscus acid and citric acid content, the major organic acids identified in this study, remained unaffected by the decoction process (Table 2). It is noteworthy that most studies carried out with roselle have associated its beneficial health effects to their high content of anthocyanins, phenolic acids, and non-pigmented flavonoids, whereas only few studies have focused on the bioactive potential of organic acids (Izquierdo-Vega *et al.*, 2020). In this regard, Morales-Luna *et al.* (2018) demonstrated that white roselle calyx extract, with a high organic acid content and

no anthocyanins, exert a similar anti-obesogenic effect than red roselle calyx extract with a high anthocyanin content but low organic acid content. Among the composition of organic acids found in roselle, citric acid has been attributed with high antioxidant, anti-inflammatory and anti-coagulant activities, whereas hibiscus acid shows anti-diabetic and anti-hypertensive potential. On the other hand, hydroxycitric acid has been recently proposed as an anti-obesity nutraceutical; however, most studies have been assessed in hydroxycitric acid isolated from *Garcinia cambogia* (Yang *et al.*, 2020).

The roselle decoction analyzed in this study was found to have hibiscus acid as the major component, accounting for 79.9 % of the identified organic acids, followed by delphinidin sambubioside (Table 2). Moreover, dihydroxybenzoic acid hexoside represented 73.7 % of all hydroxybenzoic acids, while the three caffeoylquinic acid isomers collectively made up to 80.5 % of the hydroxycinnamic acids. These results are

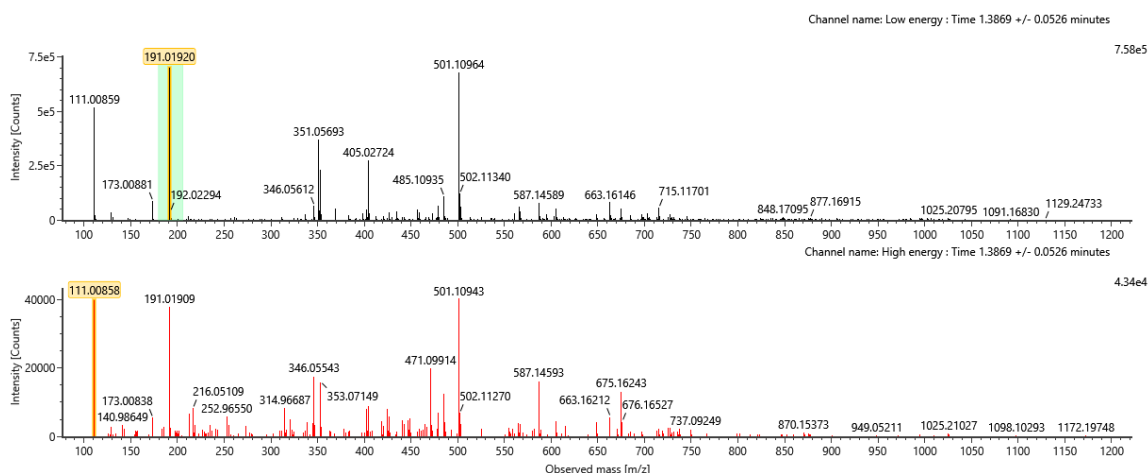


Figure 6. High-resolution mass spectra of citric acid. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15-45 V (high collision energy).

Figura 6. Espectro de masas de alta resolución de ácido cítrico. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15-45 V (alta energía de colisión).

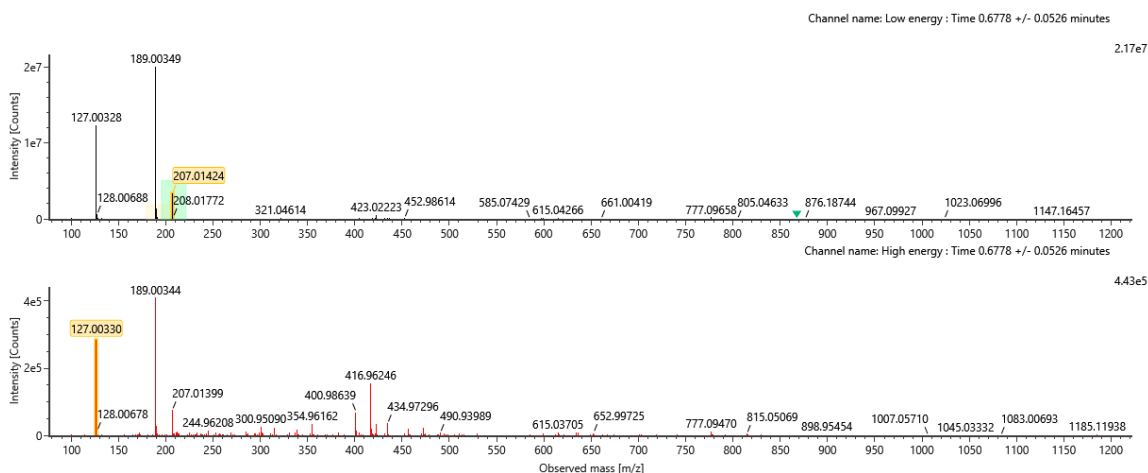


Figure 7. High-resolution mass spectra of hibiscus acid. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15-45 V (high collision energy).

Figura 7. Espectro de masas de alta resolución de ácido hibiscus. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15-45 V (alta energía de colisión).

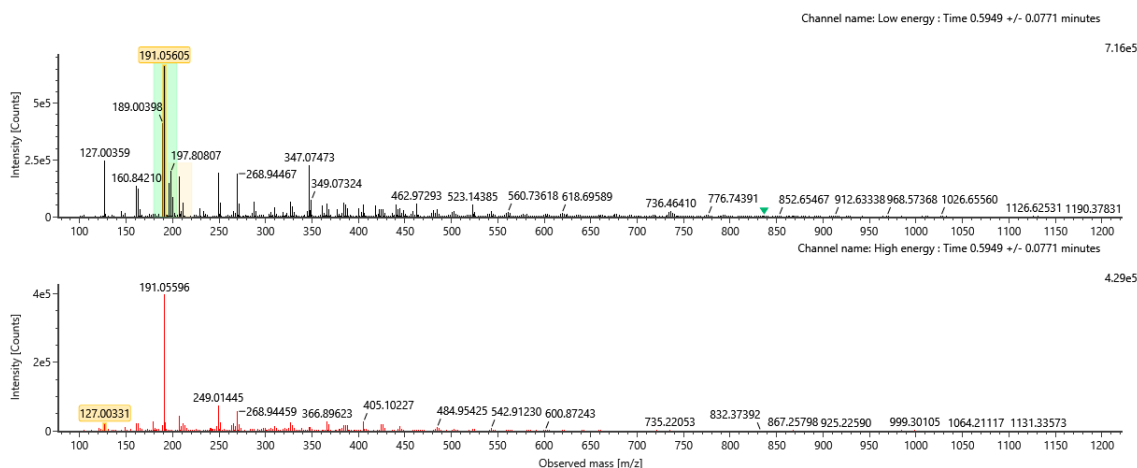


Figure 8. High-resolution mass spectra of quinic acid. Upper mass spectra acquired at 6 V (low collision energy) and lower mass spectra acquired at 15–45 V (high collision energy).

Figura 8. Espectro de masas de alta resolución de ácido quínico. El espectro de masas superior fue adquirido a 6 V (baja energía de colisión) y el espectro de masas inferior fue adquirido a 15–45 V (alta energía de colisión).

consistent with previous studies demonstrating that roselle calyx decoctions are rich in bioactive compounds, known for their numerous health benefits (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014; Ríaz and Chopra, 2018; Bedi *et al.*, 2020; Sapián *et al.*, 2023).

Interestingly, organic acids were identified in both acid and alkali hydrolysable fractions, with higher amounts in the acid hydrolysis fraction. It is noteworthy that quinic acid has been reported to be obtained after the hydrolysis of caffeoylquinic acids and other phenolic acids esterified with quinic acid (Clifford *et al.*, 2017). Nevertheless, hibiscus acid and quinic acid were found to be increased by 1.3-fold in the roselle decoction by-product compared to the roselle calyxes. The non-extractable fractions of the roselle decoction by-product primarily consisted of hydroxybenzoic acid derivatives, which were enriched by 1.9 to 2.2-fold after the decoction process (Table 4).

Antioxidant capacity of roselle calyx, decoction, and its by-product

The results indicate that the non-extractable fraction of the roselle decoction by-product exhibits significant antioxidant capacity when assessed using the DPPH method, showing a 1.1- to 3.4-fold increase as compared to roselle calyxes before the decoction process (Table 5). However, the antioxidant capacity, as determined by the ABTS and FRAP assays, is notably lower, with reductions of 1.6- to 9.9-fold and 7.0- to 2.4-fold, respectively. These findings suggest that the non-extractable fraction of the roselle decoction by-product contains antioxidant components, such as polyphenols and organic acids, that are effective in donating protons and scavenging the DPPH radical. On the other hand, it appears to have a limited ability to donate electrons, as indicated by the reduced capacity in scavenging the ABTS radical and reducing Fe^{3+} . This variation in antioxidant activity across different assays highlights the diverse mechanisms by which antioxidants can operate and underscores the importance of

considering multiple methods for a comprehensive evaluation of antioxidant potential (Danet, 2021).

Notably, this study presents the first quantitative profile of the non-extractable fraction of roselle calyxes and their decoction by-product. Moreover, we demonstrate that hibiscus acid, the major roselle organic acid, is not only found as a free component but can also be found bound to the matrix by glycosidic linkage, as observed in the composition of the acid hydrolysable fraction. Few studies have determined non-polyphenol constituents in the non-extractable fraction. In this regard, Dong *et al.* (2021) identified eleven organic acids, along with several polyphenols, bound to carrot dietary fiber which were released by alkaline hydrolysis, contributing to its antioxidant capacity. Therefore, further studies must be undertaken to fully characterize the non-extractable fraction of plant sources and wastes.

CONCLUSIONS

This study highlights the substantial content of diverse extractable and non-extractable constituents with significant antioxidant potential in the waste generated during roselle decoction. The extraction and purification of these compounds for use as nutraceuticals, or in the creation of innovative value-added dietary supplements or functional foods, could contribute to a circular economy by reclaiming and repurposing an underappreciated waste stream with potential health benefits.

ACKNOWLEDGMENTS

This research study was supported by Fondo para el Desarrollo del Conocimiento (FONDEC-UAQ) 2022 (Grant no. FQU-2022-08). The authors are grateful to CONAHCYT for the scholarships granted to E.S.-T. and A.M.S.-G. We thank the Chemistry Faculty of the Universidad Autónoma de Querétaro for providing facilities for the UPLC-ESI-Q-ToF MS analysis (CONAHCyT project number: INFR-15-255182).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no actual or potential conflict of interests, including financial, personal or relationship with other organizations.

REFERENCES

- Amaya-Cruz, D., Pérez-Ramírez, I.F., Pérez-Jiménez, J., Nava, G.M. and Reynoso-Camacho, R. 2019. Comparison of the bioactive potential of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MSE and their anti-obesity effect *in vivo*. *Food Research International*. 126: 108589.
- Amaya-Cruz, D.M., Perez-Ramirez, I.F., Ortega-Diaz, D., Rodriguez-Garcia, M.E. and Reynoso-Camacho, R. 2018. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by-product as functional ingredient: effect of thermal processing and particle size reduction on bioactive constituents and functional, morphological, and structural properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12: 135-144.
- Báez-García, E., Sáyo-Ayerdi, S.G. and Pérez-Jiménez, J. 2023. Non-extractable polyphenols should be systematically included in polyphenol analysis. *Recent Advances in Polyphenol Research*. 8: 193-238.
- Bedi, R., Bedi, S. and Chawla, P. 2020. Effect of pH on the extraction of anthocyanin from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44: e14962.
- Bhadra, P. 2020. In-silico analysis of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) for antidiabetic. *Indian Journal of Natural Sciences*. 10: 20764-20768.
- Clifford, M.N., Jaganath, I.B., Ludwig, I.A. and Crozier, A. 2017. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*. 34: 1391-1421.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L.—a phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. 165: 424-443.
- Debnath, B., Haldar, D. and Purkait, M.K. 2021. Potential and sustainable utilization of tea waste: A review on present status and future trends. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9: 106179.
- Ding, Y., Morozova, K., Scampicchio, M. and Ferrentino, G. 2020. Non-Extractable polyphenols from food by-products: Current knowledge on recovery, characterisation, and potential applications. *Processes*. 8: 925.
- Dong, L., Li, S., Zhang, D., Li, X., Wang, X. and He, Z. 2021. Structural characterization of dietary fiber–polyphenol complexes and their influence on polyphenol bioaccessibility in carrots using high-resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*. 335: 127596.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G. and Saso, L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1721: 174-184.
- Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3597-3604.
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 1: F1-2.
- Hassan F.A., Ismail A., Hamid A.A., Azlan A. and Al-Sheraji S.H. 2011. Characterization of fibre-rich powder and antioxidant capacity of *Mangifera pajang* K. fruit peels. *Food Chemistry*. 126: 283-288.
- Hinojosa-Gómez, J., San Martín-Hernández, C., Heredia, J.B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T. and Muy-Rangel, M.D. 2020. Anthocyanin induction by drought stress in the calyx of roselle cultivars. *Molecules*, 25: 1555.
- Izquierdo-Vega, J.A., Arteaga-Badillo, D.A., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J.A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C.A., Castro-Rosas, J., Delgado-Olivares, L., Madrigal-Bujaidar, E. and Madrigal-Santillán, E. 2020. Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*. 8: 100.
- Jaiswal, Y., Liang, Z. and Zhao, Z. 2016. Botanical drugs in Ayurveda and traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 194: 245-259.
- Jamrozik, D., Borymska, W. and Kaczmarczyk-Żebrowska, I. 2022. *Hibiscus sabdariffa* in diabetes prevention and treatment—Does It Work? An Evidence-Based Review. *Foods*. 11: 2134.
- Kakkar, S. and Bais, S. 2014. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *International Scholarly Research Notices*. 2014: 952943.
- Lin, H., Tello, E., Simons, C.T. and Peterson, D.G. 2022. Identification of subthreshold chlorogenic acid lactones that contribute to flavor instability of ready-to-drink coffee. *Food Chemistry*. 395: 133555.
- Long, Q., Chen, H., Yang, W., Yang, L. and Zhang, L. 2021. Delphinidin-3-sambubioside from *Hibiscus sabdariffa*. L attenuates hyperlipidemia in high fat diet-induced obese rats and oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Bioengineered*. 12: 3837-3849.
- Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F.J., Velderrain-Rodríguez, G.R., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Alvarez-Parrilla, E. and Sáyo-Ayerdi, S.G. 2015. Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Functional Foods*. 18: 171-181.
- Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I.F., Salgado, L.M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C.A. and Reynoso-Camacho, R. 2019. The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99: 596-605.
- Oomah, B.D., Cardador-Martínez, A. and Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 935-942.
- Quatrin, A., Pauletto, R., Maurer, L.H., Minuzzi, N., Nichelle, S.M., Carvalho, J.F.C., Maróstica, M.R., Rodriguez, E., Bochi, V.C. and Emanuelli, T. 2019. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 78: 59-74.
- Rababah, T.M., Ereifej, K.I., Esoh, R.B., Al-udatt, M.H., Alrababah, M.A. and Yang, W. 2011. Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Natural Product Research*. 25: 596-605.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.
- Reynoso-Camacho, R., Sotelo-González, A.M., Patiño-Ortiz, P., Rocha-Guzmán, N.E. and Pérez-Ramírez, I.F. 2021. Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low-and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols. *Food and Bioprocess Technology*. 127: 371-387.
- Ríaz, E. and Chopra, D. 2018. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed protein isolate: extraction optimization and physicochemical properties. *Food Chemistry*. 240: 1141-1148.
- Rothwell, J.A., Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Medina-Ramon, A., M'Hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, K., Eisner, R., Wishart, D. and Scalbert, A. 2013. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on a polyphenol content. *Database*. 2013: bat070.
- Salem, M.A., Michel, H.E., Ezzat, M.I., Okba, M.M., El-Desoky, A.M., Mohamed, S.O. and Ezzat, S.M. 2020. Optimization of an extraction solvent for angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Hibiscus sabdariffa* L. based on its UPLC-MS/MS metabolic profiling. *Molecules*. 25: 2307.
- Sapian, S., Ibrahim Mze, A.A., Jubaidi, F.F., Mohd Nor, N.A., Taib, I. S., Abd Hamid, Z., Zainalabidin, S., Anuar, N.N.M., Katas, H., Latip, J., Jalil, J., Abu Bakar, N.F. and Budin, S.B. 2023. Therapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa* Linn. in attenuating cardiovascular risk factors. *Pharmaceuticals*. 16: 807.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E. and Goñi, I. 2014. By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 898-904.
- Selli, S., Cabaroğlu, T., and Canbas, A. 2021. The aroma of Turkish red rose (*Rosa damascena* Mill.) hydrosols. *Food Chemistry*. 346: 128954.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Trinh, L. T. P., Choi, Y. S., and Bae, H. J. 2018. Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Industrial Crops and Products*. 125: 261-268.
- Yang, D., Xu, H.X., Guo, Y.X. and Zhang, Q.F. 2023. Chemical profile of Roselle extract and its inhibitory activities on three digestive enzymes in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 253: 126902.
- Zurita, J., Díaz-Rubio, M.E., and Saura-Calixto, F. 2012. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 63: 936-939.