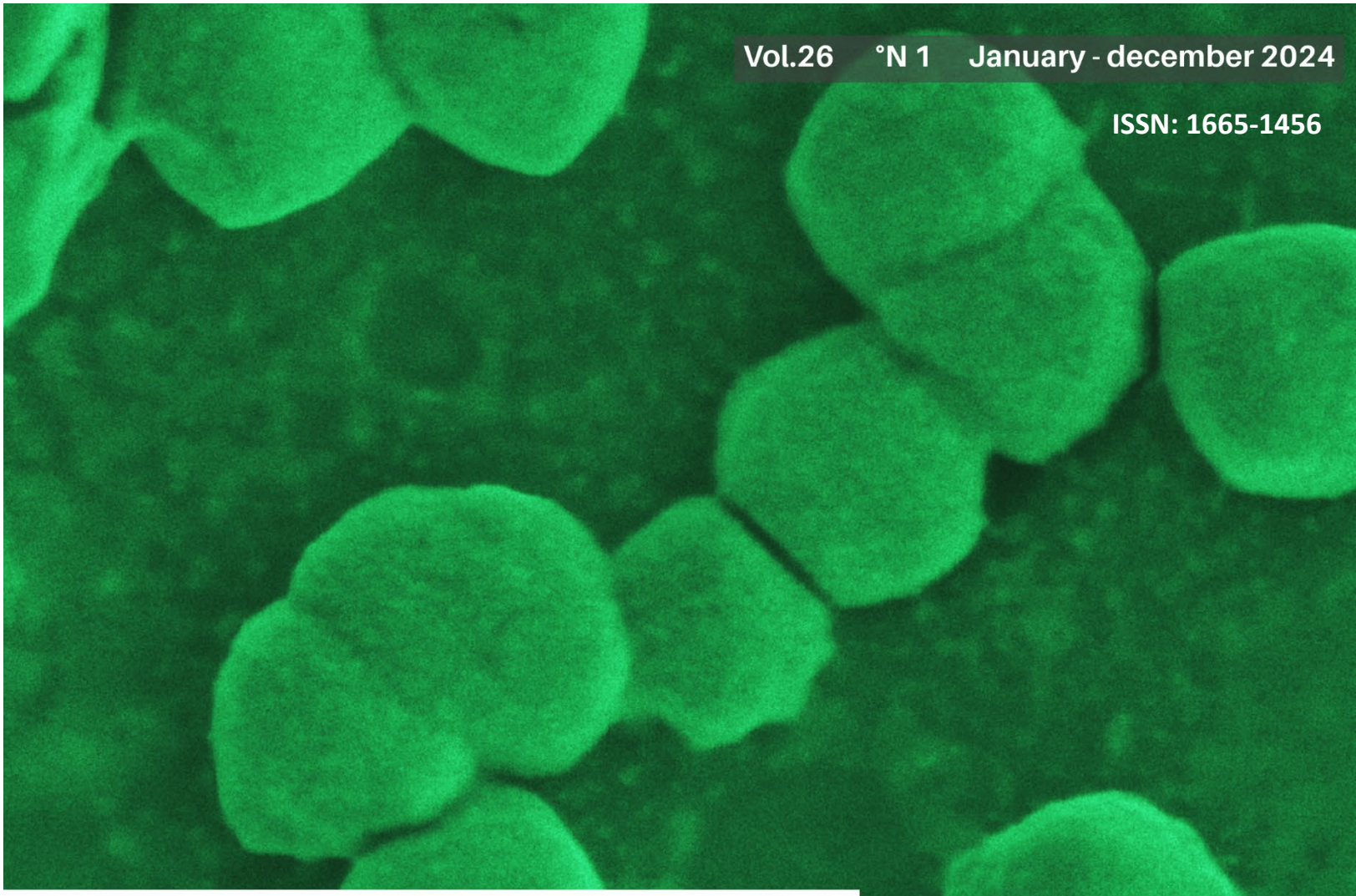
Vol.26 °N 1 January - december 2024

ISSN: 1665-1456



Biotecnia

Journal of biological and health sciences
Edited by Universidad de Sonora

http://biotecnia.unison.mx

ISSN: 1665-1456

BIOTECNIA, 2024, volumen XXVI (enero - diciembre) es una publicación de periodicidad electrónica anual continua editada por la Universidad de Sonora, página web: https://www.biotecnia.unison.mx, correo-e: biotecnia.difusion@unison.mx. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 04-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Editora Responsable de la última actualización de este número: Jesús Adriana Soto Guzmán.



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

Biotecnia

Contenido Vol. XXVI

Apartado especial: Ética y Bioética en la Investigación Científica

e2374 **Células, Genes y Datos: Biobancos como Bienes Comunes.** Pinto Bustamante B. J.

e2348 **La regulación de la investigación científica en México: Un análisis de los marcos éticos y normativos desde la CONBIOÉTICA hasta los Comités de Ética en Instituciones de Educación Superior.** María Guadalupe Sánchez Trujillo, Carlos Alfredo Martínez Sánchez

e2346 **Revisitando los contenidos curriculares y las actitudes bioéticas de los alumnos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.** David Sebastian Contreras Islas, D Amador Águila, Norberto Abraham Tenorio Olivares, Carlos Kerbel Lifshitz, Marco Aurelio Pérez Hernández, Enrique Mendieta Márquez

e2252 **Bases jurídicas, normativas y éticas de la investigación en seres humanos, en México. Normativa de la investigación en seres humanos en México.** Maria del Carmen Candia Plata, Diana Judith Leverda González, Mariana Pacheco Quiroz, Oswaldo Humberto Vázquez Medina, Gerardo Álvarez Hernandez, Luis Fernando López Soto

Artículos Originales

e2286 **Actividad Antioxidante, Antiproliferativa y Antibacteriana de Extractos de *Phoradendron californicum*; una Planta Parásita del Noroeste de México.** Pablo Mendez-Pfeiffer, Manuel G Ballesteros-Monrreal, Mario Leyva, Jes´ús Ortega-García, Beatriz Montaño-Leyva, Milagros Aguilar-Martinez, Dora Edith Valencia Rivera

e2327 **Estrategia de manejo de *Brassica oleraceae L var Capitata*, empleando buenas prácticas agrícolas, Jinotega, Nicaragua. Buenas Prácticas Agrícolas en Repollo.** Freddy Rivera, Juan Carlos Morán Centeno

e2325 **Efecto de la concentración y forma iónica del nitrógeno (N) en la fotosíntesis, crecimiento y producción de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*).** Raul Cárdenas-Navarro, Jesús Alonso Luna-Béjar, Vilma del Carmen Castellanos-Morales, Nayda Luz Bravo-Hernández, Luis López-Pérez

e2321 **Efecto bioestimulante de *Macrocystis pyrifera* en esporas *de Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad contra *Chloridea virescens*.** Lucia Araceli Manzanarez Jiménez

e2317 **Componentes de rendimiento de cártamo en mínima labranza y rotación de cultivos comparado con labranza tradicional.** Alberto Borbón Gracia, Gabriel Antonio Lugo Garcia, Carlos Patricio Sauceda Acosta, Victor Valenzuela Herrera, Xochilt Militza Ochoa Espinoza

e2316 **Propiedades de gelificación de carne de jaiba (*Callinectes sapidus*) adicionada con gelatina y *transglutaminasa* microbiana. Gelificación de proteínas de jaiba.** EA Cortés Morales, M. A. Martínez Maldonado, E Morales Sanchez, R Uresti Marín, J A Ramírez de León, G Velazquez

e2313 **Efecto de las fitonanopartículas de óxido de zinc y magnesio en la producción de *rebaudiósidos* y compuestos fenólicos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.** Maria Concepcion Velazquez Gamboa, Ludwi Rodríguez Hernández, Miguel Abud Archila, Federico Antonio Gutiérrez Miceli, Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo, Benjamín Valdez Salas, Dalia Margarita Ferrer Sánchez, María Celina Luján Hidalgo

e2308 **Fitoextractos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* y su potencial antidiabético.** Iza F. Pérez-Ramírez, Julio C. Rubio-Rodríguez, Luis M. Salgado-Rodríguez, Ofelia Mora, Maria L. González-Dávalos, Rosalía Reynoso Camacho

e2303 **Efecto de la UV-C en la calidad postcosecha de cítricos de la región nororiente del Valle del Cauca, Colombia.** Julián Acevedo Daza, Jorge Andrés Villegas Ciro, Valentina Pineda Sepulveda, Juan Camilo Jaramillo González, Viviana Restrepo Cubillos, Jessica Tatiana Peña García, José Hernán Soto Bastidas, Liseth Tatiana Buitrago Pinilla, Johanna Valentina Arroyo Merino, Diana Carolina Ñañez Palacio, Diego Fernando Castro Vargas, Esteban Largo Ávila, Alba Mery Garzón García

e2301 **Actividad de un bioestimulante en la tasa fotosintética y contenido de clorofila de *Ocimum basilicum L.* sometida a estrés por NaCl.** Dra. Daulemys Batista-Sánchez, Dr. Bernardo Murillo-Amador, Dr. Carlos Michel Ojeda-Silvera, Dra. Alejandra Nieto-Garibay, Dr. José Manuel Mazón-Suástegui, Dra. Betzabé López-Corona

e2292 **Modelado del crecimiento radial de *Amyomyces rouxii* y su tolerancia a compuestos activos farmacéuticos seleccionados.** Hugo León-Santiesteban, Estefanía Paola Severo, Araceli Tomasini

e2329 **Impacto de la bioestimulación con nanopartículas de ZnO y el poliacrilato de potasio en la producción de pimiento bajo estrés hídrico.** José Antonio Ríos-Peña, Alonso Méndez-López, Antonio Juárez-Maldonado, Miriam Sánchez-Vega, Alberto Sandoval-Rangel, Susana González-Morales, Rebeca Betancourt-Galindo

e2284 **Percepción y uso de la medicina herbaria en Hermosillo, Sonora (noroeste de México).** Ildefonso Guerrero, Javier N. Gonzáles-Gonzáles, Gloria G. Morales-Figueroa , Jesús F. Ayala-Zavala, Marco A. López-Mata, Ana I. Ledesma-Osuna, Gustavo A. González-Aguilar, Raymundo R. Rivas-Cáceres, Luis Quihui-Cota

e2283 **Relación entre composición corporal y desempeño físico en triatletas aficionados de media distancia.** A M Manrique Lenis, D C Garcia-Chaves, L F Corredor-Serrano, S Aly Forero, S A Arboleda-Franco

e2281 **CREENCIAS SOBRE EL RIESGO DE LESIONES MUSCULOESQUELÉTICAS ASOCIADAS A LA PRÁCTICA DE CROSSFIT.** Andres Castaño, Iván Jiménez, Jazbreydi Rosero, Melany Ramírez, Andrea Patricia Calvo-Soto

e2280 **CONCENTRACIÓN DE *ESTEVIÓSIDO* Y *REBAUDIÓSIDO-A* EN PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI EN INTERACCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES Y FÓSFORO.** Rodrigo A. Cauich-Cauich, Emanuel Hernández-Núñez, MONICA GUADALUPE LOZANO-CONTRERAS, José María Tun-Suárez, Hugo Pilotzi-Xahuentitla, Rubén Humberto Andueza-Noh, Carlos Juan Alvarado-López

e2277 **Actividad antibacteriana de extractos orgánicos de hojas de *Solidago graminifolia.*** Guadalupe Tobías, José Ramírez De León, Juan Francisco Castañón Rodríguez, Francisco A. Paredes-Sanchez, Alma D. Paz-González, Gildardo Rivera, Elsa Verónica Herrera-Mayorga

e2268 **Microencapsulación de jugo de pitaya (*Stenocereus stellatus*) por secado por aspersión usando mezclas de fructanos, proteína de suero y almidón modificado como agentes acarreadores.** María Aurora Soto-Dagnino, Miguel Ángel Sánchez-Madrigal, Erick Heredia-Olea, Carmen Oralia Meléndez-Pizarro, Rosa Isela Ortiz-Basurto, Rosa Isela Ortiz-Basurto, Daniel Lardizábal-Gutiérrez, Francisco Paraguay-Delgado, David Neder-Suárez, Armando Quintero-Ramos

e2261 **Polimorfismo del gen PAPPA2 asociado con la fertilidad postparto en vacas lecheras de raza Holstein manejadas bajo condiciones cálidas en el sur de Sonora México.** Pablo Luna Nevarez, Isabel Álvarez-Tavares, José Torres Simental, José Leyva-Corona, Juan F. Medrano, Milton G. Thomas, Ricardo Zamorano-Algandar, Manuel Nieblas-López

e2257 ***Bougainvillea spectabilis* como mediadora para la biosíntesis de nanopartículas de plata, evaluación de su efecto antimicrobiano y citotóxico.** Angel Daniel Ramírez-Herrera, Gloria Barbosa-Sabanero, María-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy, Martha-Isabel González-Domínguez

e2256 **Detección del Virus de la Mancha Necrótica de Impatiens (INSV) en trips y plantas ornamentales mediante RT-LAMP.** Mar´ía de los Ángeles Garcia-Chavéz, Edgar Martínez Fernández, Porfirio Juárez López , Irán Alia Tejacal , Víctor López Martínez , Nelson Avonce

e2389 **Propiedades fisicas y quimicas de sustratos formulados con bagazo de agave y corteza de pino sometidos a explosión con vapor.** Juan Manuel Ruvalcaba Barrios, Eduardo Salcedo Pérez, Laura Liliana Acosta Sotelo, Jose Anzaldo Hernández, Víctor Manuel Ordaz Chaparro, Diego Raymundo González Eguiarte, Ramon Rodriguez Macias

e2441 **Síntesis y caracterización de películas poliméricas compuestas de PbI2 / PVA para aplicaciones**

optoelectrónicas. Bryan Maca Ossa, Jeisson Javier Solís Mosquera, Dagoberto Cabrera Germán, Guillermo Suárez Campos, Mérida Sotelo Lerma

e2439 **Extracto polifenólico de hojas de mango (*Mangifera indica L.*): Microencapsulación, caracterización fisicoquímica y actividad antifúngica in vivo.** Jesus Emmanuel Domínguez´-Ruvalcaba, Montserrat Calderón-Santoyo, Katia Nayely González-Gutiérrez , Juan Arturo Ragazzo-Sanchez

e2435 **La Pandemia de COVID-19 y su efecto en la nutrición de familias en zonas marginadas de Hermosillo.** Andrea Félix Gutiérrez, Gloria Elena Portillo Abril, María Isabel Grijalva Haro, Trinidad Quizán Plata, Alma Delia Contreras Paniagua, María Isabel María Isabel

e2429 **Perfil enterotoxigénico, producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana de *Bacillus cereus* aislado de arroz comercializado al sur de México.** Joel Reyes-Roldan, Mariela Cano-Ponce, Luis-Fernando Gaspar-Nava, José-Humberto Perez-Olais, Salvador Muñoz-Barrios, Hugo-Alberto Rodriguez-Ruiz, Arturo Ramirez- Peralta

e2423 **Elementos genómicos asociados a la formación de biopelículas en *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie lactis.** César Onoshi Sedano-Juaréz, Joivier Vichi-Lozada, Rodolfo Lagunes-Quintanilla, Raúl Dávila-Delgado, América Ivette Barrera-Molina

e2422 **Inducción de microorganismos eficaces (EM) en la masa fermentativa del cacao (*Theobroma cacao L.*) y su incidencia las características físico química y antioxidante.** Frank Guillermo Intriago Flor, Jossenka Cedeño Loor, Carlos Parraga Muñoz, Kerly Alvarado Vásquez, Luis Vásquez Cortez, Karol Revilla Escobar, Jhonnatan Aldas Morejon

e2420 **Cambios fisiopatológicos renales en hamster sirio-dorado (*Mesocricetus auratus*) diabéticos alimentados con dieta hipercalórica.** Francisco Javier Gálvez-Gastélum, Bertha Adriana Alvarez-Rodríguez, Irinea Yañez-Sánchez, José Alfredo Domínguez-Rosales, Citlali Arlae Rojas-López, Jaime Palomares-Marín, Itzae Adonai Gutierrez Hurtado, Adriana María Salazar Montes, José María Vera-Cruz

e2416 **Aplicación potencial de residuos agroforestales en la adsorción de anilina.** Perla Alejandrina González-Tineo, Yedidia Villegas Peralta, Beatriz Guadalupe González-González, Edna Rosalba Meza-Escalante, Denisse Serrano-Palacios

e2414 **Síntesis de acilgliceroles estructurados con AGPI n3 en un reactor de lecho empacado con recirculación: Optimización por superficie de respuesta.** Juan Antonio Noriega Rodríguez, Correa-Leyva C., Carrillo-Perez E, García H.S.

e2410 **Caracterización química de frutos de mangostán *Garcinia mangostana L.* cultivados en Tuxtla Chico, Chiapas, México.** Alexis Eduardo Martínez Rodríguez , Juan Manuel Villarreal Fuentes, Pedro Antonio Moscoso Ramírez, Iran Alia Tejacal, Francisco Guevara Hernández

e1924 **Composición de gremios tróficos de invertebrados en un bosque de pino-encino en Durango.** María Fernanda Sánchez-alfaro, María Guadalupe Viggers-Carrasco, José Gamaliel Castañeda-Gaytan, Josué Raymundo Estrada-Arellano, Jorge Luis Becerra-López, Jesús Lumar Reyes-Muñoz

e2379 **Riqueza y distribución de quelites de Durango, México: un análisis basado en datos del GBIF.** Hugo Manuel Monreal-García, Norma Almaraz-Abarca, José Antonio Ávila-Reyes, Rene Torres-Ricario, Eli Amanda Delgado-Alvarado, Marcela Verónica Gutiérrez-Velázquez, Ana Carolina González-Trillo, Andrés Vasavilbazo-Saucedo

e2378 **Extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* con potencial para el tratamiento de la aterotrombosis.** Gabriela Soledad Barragán Zarate, Luicita Lagunez Rivera, Rodolfo Solano, Jesús Hernández Juárez , Abimael Lopez Perez , Candy Carranza Álvarez

e2361 **Efecto de extractos etanólicos de *Ardisia compressa Kunth* y acaricidas botánicos comerciales en *Tetranychus urticae* (*Acari:Tetranychidae*).** Esaú Ruiz Sánchez, Jesús Molina Maldonado, Marcos Enrique Cua Basulto, Emanuel Hernández Núñez, Rubén Andueza Noh, Kati Medina Dzul

e2356 **Toxicidad aguda de pimetrozina y flonicamid en dos especies de abejas sin aguijón.** G Uh-EK, E Ruiz-Sánchez, H Ballina-Gómez, C Góngora-Gamboa

e2354 **Diversidad de parasitoides (*Hymenoptera*) en diferentes estados sucesionales de la selva mediana subcaducifolia.** Walther Torres-Cab, Esaú Ruíz-Sánchez, Gabriel Antonio Lugo García, Alejandra González Moreno

e2350 **Jícama mínimamente procesada fortificada con probióticos y compuestos fenólicos de café verde microencapsulados.** Miguel Abud-Archila, Claudia Mendoza

e2340 **Prototipo de sorbete comestible con propiedades nutracéuticas.** Michelle Carolina Pazmiño, Claudia Inés Victoria-Campo, Vania Urias-Orona, Heriberto Castro-García, Andrea Arreguín

e2156 **Predominancia de especies forestales y asociación de hongos fitopatógenos en árboles de la Ciudad de México.** José Francisco Reséndiz Martínez, Mónica Gutiérrez-Rojas, Pablo Preciado-Rangel, Ana Lilia Viveros Muñoz, Daniel Ruiz-Juárez

e2063 **Producción sostenible de biogás mediante co-digestión anaerobia de lactosuero y estiércol bovino.** Marco Arturo Velasco Morales, José Apolonio Venegas Venegas, Mariela Beatriz Reyes Sosa, Raul Hernández-Altemirano, Rene Pinto Ruiz, Pascual López de Paz, Carlos Alonso Meza Avendaño, Fidel Alejandro Aguilar Aguilar

e2057 **Efecto de dos tipos de contenedores y dos tipos de fertilización en el crecimiento de patrones de cacao (*Theobroma cacao L*) bajo condiciones de vivero.** Milton Rivera Rojas, A.R.Caballero-Lopez, J.A. Arias-Rojas, Y. Romero-Barrera, Lombo-Ortiz

e2052 **Aplicación foliar suplementaria de Boro, Manganeso y Molibdeno**

como inductores de crecimiento, rendimiento y concentración de fitoquímicos en el cultivo de tomate. Microelementos en Tomate Saladette. Mariana Isabel García-Terrazas , Adalberto Benavides-Mendoza , Susana González-Morales, Julia Medrano-Macías , Marcelino Cabrera-De La Fuente

e2011 **Hongos micorrizícos arbusculares mejoran el establecimiento de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum L.*) en condiciones de salinidad.** Andrés Adrián Urías Salazar, Benjamín Abraham Ayil Gutiérrez, José Alberto López Santillán, Benigno Estrada Drauaillet, Miguel Ángel Cano González, Jesús Guillermo Hernández Martínez, Wilberth Alfredo Poot Poot

e2124 **Tierra de diatomea *y Bauveria bassiana* en matrices de alcohol polivinilico, un efecto combinado para el control de Pieris brassicae.** Fernando Zárate-Rivas, Delfino Reyes-López, Fabiel Vázquez-Cruz, Carmela Hernández-Domínguez

e1992 **Actividad alelopática de extractos acuosos de especies arbóreas sobre la germinación y crecimiento inicial de dos malezas.** Victor Gabriel Almada Ruiz, Álvaro Reyes Olivas, Gabriel Antonio Lugo García, Laura Delia Ortega Arenas, Celia Selene Romero Félix, Bardo Heleodoro Sánchez Soto

e2134 **Prevención del aumento de peso durante las fiestas decembrinas en adultos: Ensayo Controlado Aleatorio Piloto.** Diego E. Guerrero-Magaña, Michelle M. Haby, Teresita de Jesús Martínez Contreras, Maria del Carmen Candia Plata, Ana Lourdes Mata Pineda, Julián Esparza Romero, Mauro E. Valencia, Rosa Consuelo Villegas Valle, Rolando Giovanni Díaz Zavala

e2138 **Medidas corporales lineales para predecir el peso vivo de cabras criollas en el noreste de México.** Jorge Alva-Pérez, Ivonne Ceballos-Olvera, Gerardo Noe Rosales-Martínez, Gregorio Álvarez-Fuentes, Luz Yosahandy Peña-Avelino

e2163 **Primer registro de lesiones epiteliales sugerentes de Fibropapilomatosis en tortugas Golfinas (*Lepi-dochelys olivacea*) anidadoras en Baja California Sur, México.** Alexei Vega Hernández, Helena Fernandez-Sanz, Abilene Colin, Agnese Mancini, José Alfredo Guevara-Franco, Eduardo Reséndiz

e2177 **Orujo de Uva y su efecto en el desempeño productivo y su microbiota intestinal en cerdos finalizadores.** Kevin Alberto Avilés Peterson , Maricela Montalvo Corral , Humberto González Ríos , Hector Parra Sánchez , Miguel Angel Barrera Silva , Araceli Pinelli Saavedra

e2236 **Efecto de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos de *Cosmos bipinnatus* encapsulados por liofilización.** José Eduardo Gallardo Sánchez, Juan Orozco-Villafuerte, Leticia Buendía González, José Álvarez Ramírez, Carmen Hernández Jaimes

e2233 **Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro e in silico de extractos etanólicos de hojas de *Cnidoscolus chayamansa.*** Karla Y. Posada-Mayorga, Jorge C. Ruíz-Ruíz, Zendy Evelyn Olivo Vidal, Carlos A.

Lobato-Tapia, Neith A. Pacheco-López, Iván E. Herrera-Pool, Cesar A. Irecta Najera, Xariss Miryam Sánchez Chino

e2217 **Intercambio de gases, relación isotópica de δ13C/12C y actividad enzimática en pimiento morrón bajo diferentes riegos.** LM Ruíz-Machuca, F Broetto, ML Cruz de-Souza, RB dos Santos-Coscolin, V Eliodoro Costa, M García-Carrillo, E Concilco-Alberto

e2214 **Efecto en las propiedades reológicas y texturales de pan elaborado a base de harina de trigo y harina de mijo tratada térmicamente.** Marisol Padilla-Villalobos, Luis Enrique Robles-Ozuna, Alma Rosa Islas-Rubio, Benjamín Ramírez-Wong, Nina Gisella Heredia-Sandoval, María del Carmen Granados-Nevárez, Francisco Vásquez-Lara

e2210 **Diferenciación de mezcales de cuatro especies de agave usando FT-MIR y análisis estadístico multivariado.** Rosa López Aguilar, Emanuel Hernández Núñez, Arturo Hernández Montes, Holber Zuleta Prada, José Enrique Herbert Pucheta

e2197 **Potencial de *Verrucodesmus verrucosus* en la remoción de estructuras de nitrógeno y fósforo de aguas residuales de granjas porcinas.** Ana Gabriela Zenteno Carballo, Yazmin Sánchez Roque, Sergio Saldaña Trinidad, Miguel Angel Canseco Pérez, Roberto Berrones Hernández, Yolanda del Carmen Pérez Luna

e1929 **Extractos vegetales en el crecimiento y concentración nutrimental de hojas de lechuga (*Lactuca sativa*).** Disraeli Eron Moreno-Guerrero, SARA MONZERRAT RAMIREZ-OLVERA, Heidi Liset Ojeda-Salgado, Claudio Arturo Pérez-Mercado, Libia Iris Trejo-Téllez

e2230 **De la pantalla al plato: relaciones causales entre la percepción de la utilidad del e-learning, la ansiedad, la actividad física y los hábitos de alimentación saludables en estudiantes universitarios.** Eduardo Alberto Gómez-Infante, Claudia Selene Cuevas-Castro , María Grethel Ramírez-Siqueiros, Pablo Gutiérrez-García, Roberto Andrés González-Fimbres

e2200 **Función pulmonar en paranadadores con lesión medular en Cali-Colombia. Serie de Casos. Función pulmonar en paranadadores.** Olga Lucía Hincapié-Gallón, Juan Diego Angulo Viña, Alexandra Hurtado Trujillo, Isabella Reyes Gutierrez, Maria Camila Sabogal Muñoz, Stefanie Tonguino Rosero

e2183 **Evidencia de variación morfológica en una población de refugio aislada del cachorrito de Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) (*Teleostei: Cyprinodontidae*).** Alexsandre Gutiérrez-Barragán, CARLOS ALONSO BALLESTEROS CORDOVA, Alejandro Varela-Romero, Gorgonio Ruiz-Campos, José Manuel Grijalva-Chon

e2178 **Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 3. Respiración del suelo y emisiones de gases efecto invernadero.** Laura Acosta Acosta Sotelo, Eduardo Salcedo Pérez, Gerardo Sergio Benedicto Valdés, Juan Fernando Gallardo Lancho, Juan Francisco Zamora Natera, Josefina Casas Solís

e2155 **Efectos de un extracto de hojas de *Leucaena leucocephala* en la actividad de xantina oxidasa y en los niveles séricos de oxipurinas en ratones.** Flavio Martinez-Morales, Juan R. Zapata-Morales, Juan F. López-Rodríguez, Othir G. Galicia-Cruz, Mario A. Isiordia-Espinoza, Othoniel Hugo Aragon-Martinez

e2143 **Nematodos asociados al cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) y efecto de rhizobacterias promotoras de crecimiento sobre Meloidogyne incognita (*Tylenchida: Heteroderidae*).** FABIOLA GARRIDO, MIRIAM DESIREE DÁVILA MEDINA, Agustín Hernandez Juarez

e2142 **Efecto del proceso de extrusión sobre las propiedades fisicoquímicas, fitoquímicas, y de cocción de pastas libres de gluten elaboradas a partir de harinas de arroz quebrado y garbanzo.** Samuel Arturo Delgado-Murillo, José de Jesús Zazueta-Morales, Armando Quintero-Ramos, Yazmín Alejandra Castro-Montoya, Xóchitl Ariadna Ruiz-Armenta, Víctor Limón-Valenzuela, Carlos Iván Delgado Nieblas

e2130 **Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias nativas cultivables proce-dentes de minas abandonadas en Tacna, Perú.** César Julio Cáceda Quiroz, Gisela July Maraza Choque, Dina Mayumi Chachaque Callo, Gabriela de Lourdes Fora Quispe, Diana Galeska Farfan Pajuelo, Milena Carpio Mamani

e2047 **EFECTIVIDAD DE CEPAS DE *Trichoderma* spp., Y *Lecanicillium* spp., EN EL CONTROL DE LA ROYA (*Hemileia vastatrix Berkeley & Broome*) EN EL CULTIVO DEL CAFÉ EN NAYARIT, MÉXICO.** ROBERTO SÁNCHEZ-LUCIO, ERNESTO GONZÁLEZ-GAONA, J. SAÚL PADILLA-RAMÍREZ, MIGUEL ÁNGEL GALLEGOS-ROBLES, URIEL GONZÁLEZ-SALAS, RAFAEL GÓMEZ-JAIMES, KARLA VANESSA DE LIRA RAMOS

e1878 **Relación entre el estado nutrimental y la densidad de *Tetranychus urticae Koch* en rosa de corte (*Rosa hybrida*).** AGUSTIN ROBLES BERMUDEZ, Concepción Rodríguez-Maciel, Porfirio Juárez-López, Octavio Jhonathan Cambero Campos

e1972 **Comportamiento de *Curcubita pepo* L. var. "Grey Zucchini", en la propagación de hongos micorrizógenos arbusculares nativos de suelos con diferente manejo. *Cucurbita pepo* en la multiplicación de hongos micorrizícos arbusculares.** JOSE ALBERTO GIO TRUJILLO, Carlos Juan Alvarado López, Neith Aracelly Pacheco López, Jairo Cristóbal Alejo, Arturo Reyes Ramirez, Juan Candelero de la Cruz

e1976 **Estudio de los cambios químicos en microensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) durante la fermentación en medio sólido.** ADOLFO AMADOR MENDOZA, HUMBERTO RAFAEL BRAVO DELGADO, ANA ROSA RAMIREZ SEAÑEZ, HIPOLITO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

e2004 **Efecto de la intensidad de radiación solar del sistema de pastoreo en la conducta de ovinos Pelibuey en el**

periodo lluvioso. Efecto de la intensidad de radiación solar del sistema de pastoreo en la conducta de ovinos. Jorge Martínez Melo, Jorge Orlay Serrano Torres, Abel González Morales, Norge Fonseca Fuentes, José Carlos Lorenzo Feijó, Magaly Herrera Villafranca

e2072 **Estudio preliminar de las propiedades físicas y antibacteriales de películas de almidones modificados de avena mezclados con quitosano.** Juan Manuel Tirado-Gallegos, Paul Baruk Zamudio Flores, Juan Carlos Bustillos-Rodríguez, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Rogelio Calderón-Loera, Miguel Ángel López-Mata, Glenda Pacheco-Vargas, María Hernández-González, Haydeé Yajaira López-De la Peña, Adalberto Ortega-Ortega, Gilber Vela-Gutiérrez, Vicente Espinosa-Solis

e2065 **Modelización bionómica de poblaciones de peces hiperestables. La pesquería de curvina golfina, *Cynoscion othonopterus*, como estudio de caso.** R Urías-Sotomayor, E.A. Aragón-Noriega, J Payán-Alejo, M.A. Cisneros Mata, G. Rodríguez-Domínguez

e2024 **Caracterización bioquímica y molecular de la glucoamilasa producida por la cepa de *Aspergillus niger* HPD-2. Caracterización bioquímica y molecular de la glucoamilasa.** Fernando Pérez Rodríguez, Raquel Pliego-Arreaga, Guillermo Antonio Silva-Martínez, Juan Antonio Cervantes-Montelongo

e2028 **PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOACTIVAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES BA-SADAS EN ALGINATO Y MIEL MELIPONA. PELÍCULAS COMESTIBLES BASADAS EN ALGINATO Y MIEL MELIPONA.** Emir Hernández Gómez, Tomás J. Madera-Santana, Patricia Quintana-Owen, Elizabeth Ortiz Vázquez, Jesús M. Ramón Sierra, María de Lourdes Vargas y Vargas

e2101 **Efecto del ácido oxálico en la vida poscosecha del tomate modificado con el gen TomLoxB en antisentido. Ácido Oxálico en tomate modificado genéticamente.** Wendy Mazón-Abarca, Elizabeth León García, José A. Ramirez, Hugo S. García

e2103 **Sincronía de la degradación ruminal de proteína cruda y materia orgánica de especies forrajeras como determinante de preferencia en cabras de libre pastoreo en el desierto sonorense de Baja California Sur. Degradación ruminal de proteína cruda y materia orgánica.** Rafael Ramírez Orduña, José Angel Armenta-Quintana, Juan Manuel Ramírez-Orduña, Raúl Avalos-Castro

e2128 **Utilización del extracto acuoso de cascarilla de café para mejorar la estabilidad oxidativa de homogenizados de carne de cerdo. Extracto acuoso de cascarilla de café.** Rey David Vargas Sánchez, Brisa del Mar Torres Martínez, Gastón Ramón Torrescano Urrutia, Armida Sánchez-Escalante

e2175 **Correlación espacial de dengue con estado socioeconómico y temperatura terrestre en el noroeste de México. Correlación espacial dengue.** Gerardo Alvarez-Hernandez, Daraysi Yera-Grillo,

Agustín Robles-Morúa, Javier Navarro-Estupiñán, Pablo Alejandro Reyes-Castro, Angélica Aracely Encinas-Cárdenas, Héctor Francisco Duarte-Tagles, Maria del Carmen Candia-Plata

e2181 **Monitoreo de la microbiota del hepatopáncreas asociada a genes de toxinas pirABVP en *Penaeus vannamei*. Monitoreo de la microbiota del hepatopáncreas.** Angelica Ávila-Villa, Gabriel Barco-Mendoza, Roberto Rodriguez-Ramirez, Daniel Villanueva-Zayas, Marcel Martínez-Porchas, Alma Guadalupe Villa-Lerma, Belinda Vallejo-Córdoba, Josue Delgado-Domínguez

e2058 **El cribado de hábitats marinos locales sugiere una nueva cepa, *Bacillus subtilis* MZ1, como un posible productor de ácidos grasos.** Mohamed Aboelnaga, Briksam S. Mohamed, Maha Azab, Mohammad Hegazy, Sara Saad, Dalia Abdel-Fattah H. Selim, Saadiya El-Nahas, Sabha M. El-Sabbagh, Muhammad Zayed

e2109 **Estandarización de una prueba isotérmica como una nueva herramienta diagnóstica en México para la detección molecular de *Chlamydia abortus* en pequeños rumiantes.** Carlos Eduardo Aragon López, Erika Gabriela Palomares Reséndiz, Sergio Cuevas tellechea, Javier Rolando Reyna Granados, Beatriz Arellano Reynoso, Miguel Angel Sánchez Castro, Jose Clemente Leyva Corona, Marcela Ivone Morales Pablos

e2125 **Aislamiento de bacterias nativas con potencial en la promoción del crecimiento de maíz criollo mexicano (Zea mays L.).** Monica Guadalupe Sánchez-Ceja, Pedro Damián Loeza-Lara, Santos Carballar-Hernández, Rafael Jiménez-Mejía, RICARDO IVAN MEDINA-ESTRADA

Artículos de revisión

e2287 **proteína Alfa-1 antitripsina y su papel en la fisiopatología del cáncer.** Guadalupe Avalos-Navarro, Ramiro Ramírez-Patiño, Luis Felipe Jave-Suárez, Emmanuel Reyes-Uribe

e2270 **Resistencia bacteriana en diarrea y aceite esencial de arbol de té como potencial tratamiento: revisión.** Javier Nicolás González González, Ildefonso Guerrero-Encinas, Gloria Guadalupe Morales-Figueroa, Dr. Gustavo A. González-Aguilar, Dr. Jesús F. Ayala-Zavala, Dr. Humberto F. Astiazarán-García, Dr. Marco Antonio López-Mata, Dr. Raymundo R. Rivas-Cáceres, Dr. Luis Quihui-Cota

e1986 **Uso e impacto de hongos entomopatógenos endofíticos: Su potencial en el contexto de la sostenibilidad agrícola.** Oscar Giovanni Gutiérrez Cárdenas, Hipolito Cortez Madrigal, Agustín Garzón

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Cells, Genes and Data: Biobanks as Common Goods

Células, Genes y Datos: Biobancos como Bienes Comunes

Boris Julián Pinto-Bustamante*
Bioethics Department, Life Sciences Research Group, Universidad El Bosque. School of Medicine and Health Sciences, Medical and Health Sciences Education Research Group, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

ABSTRACT

Contemporary biomedical research, propelled by bioinformatics, has revolutionized the exploration of the world through the collection and analysis of data from various biological materials. These advancements have given rise to ethical challenges, such as transformations in the practice of informed consent, issues related to privacy, equitable access to research benefits, and the privatization of genetic information. In this context, the governance of biobanks introduces ethical and legal tensions between liberal and communitarian perspectives. The privatization of biomaterials hinders global collaboration and restricts the involvement of developing countries. Experiences of community-based governance in Norway, New Zealand, Argentina, and other cases suggest alternative models. Community-based governance of biobanks emerges as an ethical approach that acknowledges cultural values such as privacy, cooperation, and active community participation in decision-making.

Keywords: Bioethics, Biological Specimen Banks, Community-Based Participatory Research, Tissue Preservation.

RESUMEN

La investigación biomédica contemporánea, impulsada por la bioinformática, ha revolucionado la exploración del mundo a través de la recolección y el análisis de datos de diversos materiales biológicos. Estos avances han dado lugar a desafíos éticos, como transformaciones en la práctica del consentimiento informado, cuestiones relacionadas con la privacidad, el acceso equitativo a los beneficios de la investigación y la privatización de la información genética. En este contexto, la gobernanza de los biobancos introduce tensiones éticas y legales entre las perspectivas liberales y comunitaristas. La privatización de los biomateriales dificulta la colaboración global y restringe la participación de los países en desarrollo. Las experiencias de gobernanza comunitaria en Noruega, Nueva Zelanda, Argentina y otros casos sugieren modelos alternativos. La gobernanza comunitaria de los biobancos emerge como un enfoque ético que reconoce valores culturales como la privacidad, la cooperación y la participación activa de la comunidad en la toma de decisiones.

Palabras clave: Bioética, Bancos de Muestras Biológicas, Investigación Participativa Basada en la Comunidad, Conservación de Tejidos

INTRODUCTION

The processes of contemporary biomedical research, stemming from the growing understanding of complex biological and environmental interactions and the development of information sciences applied to the life sciences, have revolutionized the ways in which we explore and understand the world. These bioinformatic research processes are impossible without the collection, storage, and analysis of various types of biological material and their derived and associated data. Bioinformatics has propelled the development of fields such as molecular biology, organic chemistry, cellular biology, genomics, and omics sciences, while also inaugurating novel interdisciplinary fields such as translational medicine and radiogenomics, among others (Coppola *et al*., 2019).

The establishment of repositories for diverse biomaterials (cells, tissues, blood components, nucleic acids, cell lines, proteins, other subcellular components, and organoids) is linked to the need to address complex global health issues. This involves characterizing individual and population susceptibility to certain diseases and risk factors, identifying biomarkers, and developing diagnostic tests and therapeutic strategies. These efforts are carried out through large-scale population studies, basic biomedical research, clinical trials, pathology archives, diagnostic images, and countless databases from genomic sequencing techniques, stored in virtual biobanks.

Bioinformatics applied to biomaterials achieves the transformation of individual bodies into biological data, converting the unique, individual, private, secret, and personal trait into serial, common, and representative data. This article analyzes the ethical tension between the private and communal nature of biological specimens and their derived data from the perspective of liberal communitarianism.

CHALLENGES TO THE INDIVIDUALISTIC MODEL OF BIOETHICS IN RELATION TO BIOBANKS: SOME BACKGROUND

Despite the evident public utility of biorepositories, some precedents raise concerns regarding research involving biomaterials. A 2009 lawsuit against the Texas Department of State Health Services alleged that researchers had violated the rights of newborns by not obtaining parental consent to use their blood samples for research, leading to the destruction of 5 million samples (Carmichael, 2011).

*Author for correspondence: Boris Julián Pinto
e-mail: boris.pinto@urosario.edu.co; pintoboris@unbosque.edu.co
Received: June 13, 2024
Accepted: July 31, 2024
Published: August 22, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2374

In 2010, Rebecca Skloot's book "The Immortal Life of Henrietta Lacks" (Skloot, 2010) raised questions about researchers' obligations to Henrietta Lacks, who unwittingly became a research subject when her cancer cells were used to create a significant research tool: the HeLa cell line. Concurrently, her story raises issues related to privacy, impacts on the rights of her relatives, and equitable access to the benefits of research.

In Iceland, a parliamentary agreement granted a private company, deCODE Genetics, the privilege of accessing the medical records of the entire population. The goal was to link this database with the genealogies of the Icelandic population and the collection of biological samples. The project allowed the transfer of medical data through presumed consent to a private biotechnology company. Public and medical sector distrust regarding the transfer of private data and its proper handling, as well as the use of common data for the commercial benefit of a private company, diminished the credibility of the Icelandic project (Merz *et al*., 2004). The forensic thriller "Jar City" or "Tainted Blood," written by Icelandic author Arnaldur Idridason and adapted into a film, portrays this public mistrust through Nordic noir. The story revolves around crimes, exhumations, and family secrets revealed by an official from deCODE Genetics who has access to the Icelandic biobank's database.

In 1984, John Moore sued the Regents of the University of California over the issuance of a patent protecting rights to the human T-lymphoblast cell line, with an estimated economic potential of $3 billion by 1990. This cell line was derived from Moore's spleen cells, obtained after he underwent a splenectomy for hairy cell leukemia (Lluch-Roselló, 2017), and he was unaware of these research activities. In 2010, Arizona State University settled a lawsuit arising from the alleged unauthorized use of blood samples from the local Havasupai tribe.

Given the shared nature of genetic information, a primary concern revolves around respecting the rights and interests of third parties, as "the disclosure of genetic information by individual DNA donors also exposes information about other individuals with similar genetic profiles". It is challenging to ensure confidentiality in the genomic and post-genomic era (Laurie, 2002). The challenges posed by genetics to the individualistic model of bioethics, especially regarding the practicality and relevance of individual informed consent and confidentiality, prompt a "reconsideration of the individual's primordial position in ethics"(Laurie, 2002).

GOVERNANCE OF BIOBANKS: BETWEEN LIBERALISM AND COMMUNITARIANISM

Research from biorepositories raises various questions about the relationship between the individual and society, the responsibilities, rights, and obligations of each involved party, as well as the value of these biobanks as a common resource. This involves combining genetic data characterization with health information and lifestyle data. It begs the question of whether this collective genetic heritage, by potentially contributing to better health and prosperity for communities and future generations, justifies a duty to contribute to the common good, while promoting beneficence—the notion of a good life that each agent chooses based on their own freedom.

From a liberal perspective, the relevant principle respecting the private realm of individual freedoms is the principle of permission, expressed in the practice of informed consent, which should be sought from each person for obtaining any samples aimed at any line of research.

Authoritarian communitarianism, on the other hand, emphasizes public duties over individual freedoms. For instance, Rosamond Rhodes (2008) argues that autonomy should be understood as a social norm rather than an individual ideal. Rhodes contends that all members of a society should participate in medical research, as the focus should be on the well-being of future patients rather than the present participant in the research. Instead of choosing whether to participate in research, the choice would be in which study to participate. All projects should be approved by public medical authorities and meet certain criteria to ensure their quality and relevance. Rhodes considers participation in medical research as a social duty to contribute to the common good.

From a liberal communitarian perspective, while there are obligations to the community, these must be safeguarded through the protection of individual rights. From this approach, participation in biomedical research represents an imperfect moral duty rather than an absolute obligation.

As we have stated in previous texts, the hypertrophy of the public domain of common goods without consideration of permission is equivalent to an authoritarian policy (Pinto-Bustamante, 2021). Communal duties should be promoted through affirmative actions articulated through the will of individuals and not against them. The requirement for consent in research using samples and/or associated data can only be waived in cases where its solicitation is impracticable (e.g., deceased patients, insurmountable logistical difficulties, retrospective studies with significant samples, etc.), the risk of research is not greater than the minimum, and the social value of the research justifies it, always on the basis of proper governance processes for biobanks and collections (CIOMS, 2016). It is worth noting at this point that not every sample collection constitutes a biobank. If there are no adequate governance processes, such as standards for obtaining, storing, and processing samples and data, material transfer agreements, transparent coding and anonymization processes, among others, these exceptions cannot apply (Chandrashekar *et al*., 2022).

In this regard, since the samples and the derived and associated information come from collective donation, community participation in the governance of biobanks and the oversight of research projects is relevant from the principle of reciprocity. This includes deliberation on the social value of research and access to shared benefits. Equitable participant selection should be understood as avoiding the

underrepresentation of populations that can benefit from research and preventing the exploitation of populations in vulnerable conditions. The principles of equal opportunities and difference are fundamental in determining how to distribute the benefits derived from research using biobanks. In this context, differences (e.g., the heterogeneity of samples and data as an expression of biological and cultural diversity) benefit the community at large, particularly those who are more vulnerable.

Another consideration in the context of research using biobanks pertains to property rights over bioobjects (biological samples and data). For this purpose, it is helpful to adjust the typology of private goods and common goods proposed by Elinor Ostrom (*et al*., 1994).

Distortions of ownership models (Resnik, 2004) that have characterized patent systems and intellectual property regimes, include opportunism (the scenario in which common goods are exploited to turn them into privatized goods), or refusing to be part of a patent consortium (Osorio *et al*., 2013) (like the failed regional C-tap initiative in the context of access to vaccines and technologies related to the COVID-19 pandemic), both in the pharmaceutical and biotechnological industries (e.g., through intellectual property agreements - TRIPS), transform pure common goods (the genetic heritage of biotic communities), impure common goods (the genetic heritage of anthropic communities), and private goods by dignity (the genetic information constitutive of each person), into impure private goods (e.g., genetic databases that only those who pay the corresponding licenses can access) and into goods privatized by alienation, turning biological information and its products into a commodity for private consumption (Pinto-Bustamante, 2021) (e.g., inequitable access to genetic tests and therapy) (Carmichael *et al*., 2015).

In the field of biotechnological research, biobanks become a vital source of private capitalization, although they represent biodiversity, heterogeneity, and the common genetic heritage of human and non-human biological families, ethnicities, and communities. For this reason, among others,

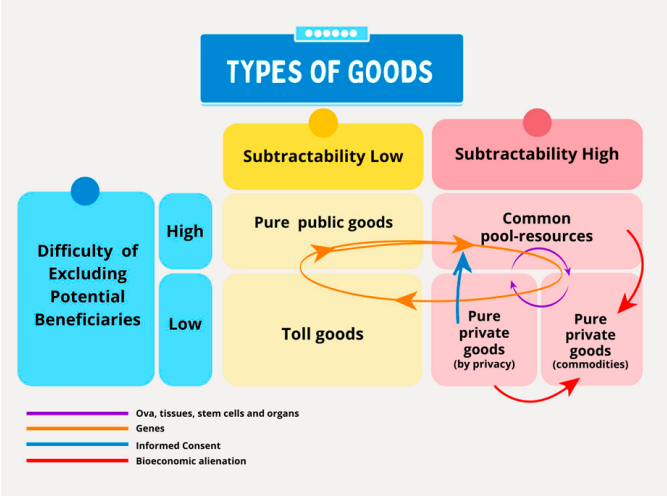


Figure 1. Bioobject classification matrix. My own proposal based on Elinor Ostrom's typology (Ostrom, 1994).

private cord blood stem cell banks have been either prohibited in several European countries or discouraged, while the social value of public banks, such as IDCBIS in Colombia, must be promoted (Pinto-Bustamante, 2021).

This trend towards the privatization of biological information, as demonstrated by cases like Myriad Genetics, DeCode Genetics in Iceland, and Celera Genomics, promotes conditions for a "tragedy of the anticommunes"(Osorio *et al*., 2013) by hindering collaborative efforts among research groups globally, limiting the participation of researchers from developing countries, and delaying the building of research capacities in these countries.

For this reason, modifications to patent systems have been introduced (Lesser, 2017), and in some jurisdictions, the possibility of patenting natural genetic sequences has been limited. Principles have also been consolidated to make genomic sequences available in public databases within 24 hours of their generation, as required by the Bermuda Agreement and in line with ethical principles outlined by the Human Genome Organization (HUGO) Ethics Committee (1996) and the Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights by UNESCO (1997). In this sense, it is worth noting that Law 2253 of 2022 in Colombia requires that "Public and private Cord Blood Hematopoietic Progenitor Banks must share their respective databases and registry to be included in the National Public Official Registry of Hematopoietic Progenitor Cell Donors (RNDCPH)" (Congreso de la República de Colombia, 2022).

COMMUNITY-BASED GOVERNANCE OF BIOBANKS: SOME EXPERIENCES

The contemporary paradigm of biomedical research seeks to overcome the paternalism that has characterized it and normative reductionism, moving towards what Emanuel *et al*. (2008) call "community-based participatory research", in which patients, research volunteers, and the community in a broader sense become partners in research efforts (Kaye *et al*., 2012). Community participation also contributes, through the diversity of collected biological specimens, to distributive justice by favoring the involvement of underrepresented populations in pharmacogenomic studies (Cohn *et al*., 2017).

Other models have been proposed to manage the governance of the common genetic heritage, from the perspective of shared responsibility and community administration of biological resources. For example, the PXE International Foundation, an initiative of families with children affected by pseudoxanthoma elasticum, a hereditary condition that affects connective tissues, established a model of a shared benefits patent between the biotechnology company that developed diagnostic tests and biomarkers (Transgenomic), and the families that contributed to the establishment of the biobank and research tests (Goold *et al*., 2014a). The project is funded by private capital and NIH public funds. It is a public-private model of collaborative research partnership that goes beyond the notion of private ownership of biomaterials

and promotes a partnership between the community, researchers, and sponsors in pursuit of common goals benefiting affected populations. It recognizes the rights of all parties involved and encourages community participation in the management of the biobank as a common good, including stewardship of the rights and interests of future generations (Resnik, 2004). This model allows for "correcting a market failure regarding the added value to research companies by patients and affected groups"(Goold *et al*., 2014b).

There are multiple examples of community participation in the governance of biobanks. One such example is the collaborative effort EngageUC (Garrett *et al*., 2015) at the University of California, where researchers, health service providers, university officials, and community members, trained to promote deliberation, participate in the governance of biobanks, as well as in the formulation of policies for managing biological specimens, associated information, and the practice of informed consent. Shared governance models have been proposed for biobanks working with genomic information (O'Brien, 2009), for managing genetic databases for forensic purposes (Etzioni, 2004), and for the administration of biobanks preserving information from indigenous communities (Allyse *et al*., 2015). Additionally, models for producing collective goods in genomic research include the Center for the Study of Human Polymorphism (CEPH), European genomic research consortia, the Personal Genome Project at Harvard University, as private sector data-sharing initiatives (SNP Consortium, Merck Gene Index, International HapMap Project, etc.), and technological proposals for interoperability that can contribute to the democratization of genomic data, such as federated data platforms (Alvarellos *et al*., 2023).

In 2009, the UK Biobank, based in Liverpool, formally invited citizens to a guided tour of the institution's facilities, lasting 2 to 3 hours. The aim was to expose the community to the project's purposes and benefits, as well as the guarantees regarding the proper use of samples and personal data. This initiative, based on building trust, is rooted in the principle of "researching with people rather than researching about people" (Thornton, 2009). A similar initiative took place in 2009 at the Vancouver Biobank (BC BioLibrary), following a structured public deliberation methodology (O'Doherty, 2012).

In Norway, citizens of Nord-Trøndela are invited to participate in the HUNT project, which includes health studies, application of instruments, and blood sample collection for the biobank. Participation in this project is based on the cultural value of "dugnad," a Norwegian tradition of voluntary and unpaid work for the benefit of the community, as well as collective action and cooperation in Norwegian society (Ursin *et al*., 2009).

In April 1977, a collective of women, mothers of individuals who disappeared during the dictatorship that ruled Argentina between 1976 and 1983, founded the organization Mothers of the Plaza de Mayo. In October of the same year, it evolved into the Grandmothers of the Plaza de Mayo movement, whose resistance was based on identifying children adopted by the dictatorship after the disappearance of their dissident parents. The resistance of this community of mothers and grandmothers led to the creation of the National Commission on the Disappearance of Persons (CONADEP), the National Commission for the Right to Identity (CONADI), as well as the creation of the National Genetic Data Bank (Penchaszadeh, 2011). This forensic bank in Argentina advises on the consolidation of the Genetic Profiles Bank of the Disappeared in Colombia, in the context of the armed conflict and forced disappearance phenomenon.

In New Zealand, a research project was carried out to construct a relational model for the development of culturally informed policies and practices related to participation in biobanks. This project included a characterization of the cultural values of the Maori community. In this context, biological samples are considered precious (taonga), sacred (tapu), and their restricted use should be entrusted to a guardian (kaitiaki). The spiritual sense of taonga (na te tapu i puta mai te tikanga) implies moral obligations, such as "sharing the gift," which means establishing a relationship through consent, and the "return of the gift," as an obligation of reciprocity and respect for the community (Beaton *et al*., 2016). In Colombia, there is a reported exercise of community-based participatory research with the Tule (or Kuna) population in Urabá, where the collective actively participates in the collection of blood samples and their subsequent disposition, following the cultural values defined by the community.

CONCLUSIONS

Beyond biological characterization and its countless clinical and research applications, bioinformation incorporates a set of values, tensions, and vital impulses. Genomic information represents the changing result of continuous interactions and mixtures between living beings, families, communities, environments, as well as cultural and political contexts. These interactions are shaped by migratory processes, emotions, violence, deprivations, and life stories, constituting a common will to live through the establishment of connections and their contradictions.

Laurie Zoloth proposes a critique of the notion of a biobank. According to her perspective, the concept of a "bank," rather than being a deposit, museum, or collection, refers to the idea of a market, secrecy, competitiveness, and hierarchy. In contrast, the concept of a "library," as a mode of organizing shared knowledge, suggests that "what we have in common should be common". In this sense, she advocates for the creation of a new Library of Alexandria based on diverse specimens and data from both locals and foreigners. This library would be linked to human freedom, creativity, and citizenship, guided by principles of justice, hospitality, and reciprocity. Following this notion, we propose understanding biobanks as vital libraries that house the movements of individual and collective memory (Vallejo, 2021), simultaneously unfolding the idea of a flexible knowledge continuously constructed and reconstructed among alphabets (biological

information), decoders (information analysts), and meanings (critical epistemologies and knowledge reconfiguration).

Community participation allows for more meaningful individual autonomy. It is worth noting that the recent Law 2287 of 2023 in Colombia, "By which the national system of biobanks is created, the operation of biobanks for biomedical, biotechnological, and epidemiological research is regulated, and other provisions are dictated", does not grant greater importance to the role of communities in the governance of collections for research purposes and biobanks. As an expression of tensions between the values of the *polis* (or the public sphere) and the *oikos* (the private sphere), we advocate in this context for a liberal communitarian model for the governance of biobanks, articulated in support of a political economy of privacy and a political economy of the common good.

CONFLICTS OF INTEREST

I declare that I have no conflicts of interest, whether financial or non-financial, pertaining to the subjects discussed in the article submitted for evaluation.

REFERENCES

Allyse, M.A., McCormick, J.B., and Sharp, R.R. 2015. Prudentia populo: Involving the community in biobank governance. American Journal of Bioethics, 15(9), pp. 1-3. doi: 10.1080/15265161.2015.1062175.

Alvarellos, M., Sheppard, H.E., Knarston, I., Davison, C., Raine, N., Seeger, T., Prieto Barja, P., and Chatzou Dunford, M. 2023. Democratizing clinical-genomic data: How federated platforms can promote benefits sharing in genomics. Frontiers in Genetics, 13. doi: 10.3389/fgene.2022.1045450.

Beaton, A., Hudson, M., Milne, M., Port, R., Russell, K., Smith, B., Toki, V., Uerata, L., Wilcox, P., Bartholomew, K., and Wihongi, H. 2016. Engaging Māori in biobanking and genomic research: A model for biobanks to guide culturally informed governance, operational, and community engagement activities. Genetics in Medicine, 19. doi: 10.1038/gim.2016.111.

Carmichael, M. 2011. Newborn screening: a spot of trouble. Nature, 475(7355), pp. 156-158. doi: 10.1038/475156a.

Carmichael, N., Tsipis, J., Windmueller, G., Mandel, L., and Estrella, E. 2015. Is it going to hurt?: The impact of the diagnostic odyssey on children and their families. Journal of Genetic Counseling, 24, pp. 325-335. doi: 10.1007/s10897-014-9773-9.

Chandrashekar, C., Shetty, S.S., and Radhakrishnan, R. 2022. Evolution of biobanks and ethical governance for the emerging applications in biomedical research. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 26(4), pp. 433-439. doi: 10.4103/jomfp.jomfp_478_22.

CIOMS. 2016. International ethical guidelines for health-related research involving humans. ISBN: 978-92-9036088-9.

Cohn, E., Henderson, G., Appelbaum, P., *et al*. 2017. Distributive justice, diversity, and inclusion in precision medicine: what will success look like? Genetics in Medicine, 19, pp. 157-159. doi: 10.1038/gim.2016.92.

Congreso de la República de Colombia. 2022. Ley 2253 de 2022. "Por medio del cual se crea el Registro Nacional Público Oficial de Donantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas y se dictan otras disposiciones - Ley Jerónimo."

Coppola, L., Cianflone, A., Grimaldi, A.M., *et al*. 2019. Biobanking in health care: evolution and future directions. Journal of Translational Medicine, 17(1), p. 172. doi: 10.1186/s12967-019-1922-3.

Emanuel, E.J., Grady, C., Crouch, R.A., Lie, R., Miller, F., and Wendler, D. (eds). 2008. The Oxford textbook of clinical research ethics.Oxford University Press. New York.

Etzioni, A. 2004. DNA tests and databases in criminal justice: Individual rights and the common good, in Lazer, D. (ed.) DNA and the Criminal Justice System: The Technology of Justice. MIT Press, pp. 197-223. Cambridge.

Garrett, S.B., Koenig, B.A., Brown, A., Hult, J.R., Boyd, E.A., Dry, S., ... and Dohan, D. 2015. EngageUC: Developing an efficient and ethical approach to biobanking research at the University of California. Clinical and Translational Science, 8(4), pp. 362-366. doi: 10.1111/cts.12259.

Goold, I., Greasley, K., Herring, J., and Skene, L. (eds). 2014. Persons, parts and property: How should we regulate human tissue in the 21st century? Bloomsbury Publishing. New York.

Goold, I., Greasley, K., Herring, J.J.W., and Skene, L. 2014. Introduction to "persons, parts and property", in Goold, I., Herring, J., Skene, L. and Greasley, K. (eds) Persons, parts and property: How should we regulate human tissue in the 21st century? Oxford: Hart, pp. 1-11. Disponible en: https://ssrn.com/abstract=3826231 (Accedido: 10 junio 2024).

Kaye, J., Curren, L., Anderson, N., Edwards, K., Fullerton, S.M., Kanellopoulou, N., and Winter, S.F. 2012. From patients to partners: Participant-centric initiatives in biomedical research. Nature Reviews Genetics, 13(5), pp. 371-376. doi: 10.1038/nrg3218.

Laurie, G. 2002. Genetic privacy: A challenge to medico-legal norms. Cambridge University Press. New York.

Lesser, W. 2017. Whither the research anticommons? From agriscience to agribusiness: Theories, policies and practices in technology transfer and commercialization, pp. 131-144. doi: 10.1007/978-3-319-67958-7_7.

Lluch Roselló, C., and Ramón Fernández, F. 2017.El caso Moore y la prestación del consentimiento informado en investigación médica. Derecho y Salud, 27(2), pp. 55-84.

Merz, J.F., McGee, G.E., and Sankar, P. 2004."Iceland Inc."?: On the ethics of commercial population genomics. Social Science & Medicine, 58(6), pp. 1201-1209. doi: 10.1016/s0277-9536(03)00256-9.

O'Brien, S.J. 2009. Stewardship of human biospecimens, DNA, genotype, and clinical data in the GWAS era. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 10(1), pp. 193-209. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150133.

O'Doherty, K.C., Hawkins, A.K., and Burgess, M.M. 2012. Involving citizens in the ethics of biobank research: Informing institutional policy through structured public deliberation. Social Science & Medicine, 75(9), pp. 1604-1611. doi: 10.1016/j.socscimed.2012.06.026.

Osorio, H., and Lara, A. 2013. La tragedia de los anticomunes en la construcción del conocimiento del genoma humano. Argumentos (México, D.F.), 26(73), pp. 147-171. Disponible

en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57952013000300009&lng=es&tlng=es (Accedido: 10 junio 2024).

Ostrom, E., Gardner, R., and Walker, J. 1994. Rules, games, and common-pool resources. Ann Arbor, University of Michigan Press.

Penchaszadeh, V.B. 2011. Forced disappearance and suppression of identity of children in Argentina: Experiences in genetic identification, in Gibbon, S., Santos, R.V. and Sans, M. (eds) Racial Identities, Genetic Ancestry, and Health in South America. Palgrave Macmillan. doi: 10.1057/9781137001702_11.

Pinto-Bustamante, B.J. 2021. Bioética, biomedicina y economías de la vida: hacia una ética de la corresponsabilidad. Editorial Universidad El Bosque. Bogotá.

Resnik, D.B. 2004. Owning the Genome: A Moral Analysis of DNA Patenting. Albany: State University of New York Press.

Rhodes, R. 2008. In defense of the duty to participate in biomedical research. American Journal of Bioethics, 8, pp. 37-44.

Skloot, R. 2010. The Immortal Life of Henrietta Lacks.Random House Audio. New York.

Thornton, H. 2009. The UK Biobank project: Trust and altruism are alive and well: A model for achieving public support for research using personal data. International Journal of Surgery, 7(6), pp. 501-502. doi: 10.1016/j.ijsu.2009.09.001.

Ursin, L., and Solberg, B. 2009. The health dugnad: Biobank participation as the solidary pursuit of the common good, in Solbakk, J., Holm, S. and Hofmann, B. (eds) The ethics of research biobanking. New York: Springer. doi: 10.1007/978-0-387-93872-1_15.

Vallejo, I. 2021. El infinito en un junco. Siruela. Bogotá.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Revisión

La regulación de la investigación científica en México: Un análisis de los marcos éticos y normativos desde la CONBIOÉTICA hasta los Comités de Ética en Instituciones de Educación Superior

The Regulation of Scientific Research in Mexico: An analysis of ethical and regulatory frameworks from CONBIOETICA to ethics committees in higher education institutions

Ma. Guadalupe Sánchez Trujillo[1] ✉ **y C. Alfredo Martínez Sánchez**[2] ✉
[1] Universidad Anáhuac Campus Mérida. Mérida, Yucatán, México.
[2] Médico Cirujano y Partero por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

RESUMEN

La regulación de la investigación científica es crucial para asegurar la integridad, seguridad y ética en los procesos de investigación. Esto protege a los sujetos de estudio y garantiza la validez de los resultados. En México, la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) juega un papel central como promotora de la ética en la investigación, en colaboración con comités de ética y bioética en universidades, institutos de salud pública e instituciones académicas públicas y privadas. La legislación aplicable a la ética y bioética de la investigación científica en México incluye normativas específicas, como la Ley General de Salud y un conjunto de Normas Oficiales Mexicanas, que definen los lineamientos éticos que deben seguir los comités estatales de bioética, las universidades y los centros de salud que involucran seres vivos en sus investigaciones. Es de vital importancia que las instituciones públicas y privadas que realizan investigación científica no solo conozcan, sino también apliquen estas normativas, generando una cultura de respeto a la dignidad humana sustentada en la ética y la bioética.

Palabras clave: Ética 1; Bioética 2; derechos humanos 3; Ley 4.

ABSTRACT

The regulation of scientific research is crucial to ensuring integrity, safety, and ethics in research processes. This protects research subjects and guarantees the validity of results. In Mexico, the National Bioethics Commission (CONBIOETICA) plays a central role as a promoter of ethical practices in research, in collaboration with ethics committees and bioethics boards in universities, public health institutes, and public and private academic institutions. The legislation applicable to the ethics and bioethics of scientific research in Mexico includes specific regulations, such as the General Health Law and a set of Official Mexican Standards, which define the ethical guidelines to be followed by state bioethics committees, universities, and health centers involving living beings in their research. It is essential that public and private institutions conducting scientific research not only understand but also apply these regulations, fostering a culture of respect for human dignity rooted in ethics and bioethics.

Keywords: Ethics 1; Bioethics 2; human rights 3; Law 4.

INTRODUCCIÓN

A pesar de las barbaries posteriores, a la humanidad aún le horroriza lo acaecido en la Segunda Guerra Mundial, no tanto por lo acontecido en el campo de batalla que ya de por sí es grave por la enorme cantidad de decesos, sino por la actuación y del régimen hitleriano con relación a los campos de concentración en donde se buscó exterminar a la población judía y a las brutales prácticas de experimentación "científica" en seres humanos.

La soberbia nazi fue más allá y estableció en un conjunto de leyes cómo debían darse las actuaciones de la población alemana para lograr la supremacía de la raza. Entre ese conjunto normativo destaca la Ley para la protección de la sangre alemana y del honor alemán de 1935 en donde se declara la obligatoriedad de mantener la pureza de la sangre para la cual se prohibieron los matrimonios entre judíos y personas de sangre alemana. Además, se declararon ilegales "las relaciones extra-maritales entre judíos y súbditos del Estado de sangre alemana o de sangre parentesco" (yadvashem.org, 1998).

Es por ello por lo que la ética y la bioética se han consolidado como pilares fundamentales para el respeto de la dignidad humana en la realización de investigaciones científicas. A lo largo de la historia, diversas circunstancias, incluyendo las atrocidades cometidas durante la Segunda Guerra Mundial, han subrayado la necesidad de regular y garantizar el bienestar de los sujetos de estudio, brindándoles el trato decoroso que merecen.

En México, en las últimas décadas ha habido un gran avance en la regulación de estas materias, como respuesta a la creciente complejidad de las investigaciones en biomedicina y en todas las ciencias que realizan experimentación en seres vivos y, sobre todo, en seres humanos.

Este ensayo analiza el estado actual de la regulación para promover la ética y la bioética en la investigación científica en México, con un enfoque principal en la legislación mexicana vigente. Además, se consideran las normativas internacionales de referencia y su influencia sobre las prácticas nacionales, destacando las normativas vigentes, las instituciones clave y los desafíos presentes y futuros.

*Autor para correspondencia: Ma. Guadalupe Sánchez Trujillo
Correo-e: maria.sanchezt@anahuac.mx
Recibido: 4 de junio de 2024
Aceptado: 11 de noviembre de 2024
Publicado: 17 de diciembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2348

¿Porqué es importante la regulación de la investigación científica?

Como se mencionó, las indignantes prácticas de experimentación en personas realizadas por científicos nazis obligaron a la concreción de un marco legal para la actuación científica ética primordialmente cuando tiene implicaciones en seres vivos, sean o no humanos. Se han dado graves prácticas como el Experimento o Caso Tuskegee realizado en Estados Unidos durante 40 años (1932-1972) y en el que se utilizó a 600 personas afroamericanas para estudiar la sífilis sin respeto a la dignidad humana y sin que mediara responsabilidad por las consecuencias sufridas por los "sujetos" del experimento y la afectación a sus familias. Este hecho fue uno de los detonantes, entre una serie de casos que ponían de manifiesto los atropellos a la dignidad de los seres vivos, se creó el Consejo Nacional de Investigación en Humanos, los Consejos Institucionales de Revisión y la Oficina de Protección en la Investigación Humana (Stanford Libraries, 2024). En 1979 se dio a conocer el Informe Belmont donde se establecieron tres principios éticos básicos: respeto a las personas, beneficencia y justicia. Estos principios son el fundamento de un conjunto de requerimientos, a saber: consentimiento informado, valoración de beneficios y riesgos y selección de los sujetos de investigación.

En 1964, durante la Asamblea Médica Mundial se presentó el documento Principios Éticos para Investigaciones Médicas en Seres Humanos, conocida como la Declaración de Helsinki y en la que el principio 7 señala: "La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales" (Asociación Médica Mundial, 2024).

Ante los avances tecnológicos que actualmente se están aplicando a la medicina es necesario que se tengan leyes completas, claras y eficaces sobre la investigación científica para la salud humana, donde se enfatice el empleo riguroso de la bioética como parámetro de actuación de los científicos en aras de transparentar los procesos y técnicas que empleen para alcanzar resultados venturosos en sus proyectos de investigación.

Jorge Enrique Linares Salgado (Doctor en Filosofía por la UNAM, experto en ética y bioética) enfatiza la conexión de la bioética con todos los problemas que aquejan a la humanidad. "Por ejemplo, no tendría sentido discutir sobre la eutanasia si no existieran los medios tecnológicos para mantener a la gente con vida, conectada a un aparato. La gente se moría cuando se tenía que morir, y no había nada qué decidir" (Guerrero, 2024).

La Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA)

En 1992 se crea la Comisión Nacional de Bioética (en adelante CONBIOÉTICA), como un órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud con autonomía técnica y operativa, responsable de definir las políticas nacionales que plantea la disciplina. Como antecedente puede mencionarse el Grupo de Estudio de la Bioética establecido por el Consejo de Salubridad General en 1989. Este equipo estuvo a cargo del doctor Manuel Velasco Suárez.

El 23 de octubre de 2000 Ernesto Zedillo Ponce de León (Presidente de México 1994-2000) emite el Acuerdo presidencial por el que se crea con carácter permanente la Comisión Nacional de Bioética, considerando la transformación que se había dado en la relación médico y paciente, así como la necesidad de evidenciar los principios y valores que deben guiar la investigación en seres humanos "dado que la exploración de nuevos campos con una capacidad tecnológica cada vez mayor debe acotarse a lo que es éticamente procedente" (DOF, 2000). El Acuerdo está integrado por cinco artículos y en ellos se destaca la composición de la Comisión con el Secretario de Salud como presidente, así como los directores del Instituto Mexicano del Seguro Social, del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado y de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico, el Secretario del Consejo de Salubridad General y dos representantes de la Secretaría de Salud. El presidente de la Comisión tenía la facultad discrecional de invitar a miembros de la comunidad científica y agrupaciones de la sociedad civil, al igual que al Rector la Universidad Nacional Autónoma de México; a los directores generales del Instituto Politécnico Nacional y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; a dos rectores de universidades de las entidades federativas y a dos más de universidades privadas. (art. 3°, Acuerdo del 23 de octubre de 2000, DOF) Entre las atribuciones de la Comisión destacaban fijar los principios éticos mínimos que deberían seguirse para la atención médica en las instituciones de salud, así como recomendar los criterios que serían observados en la reglamentación de la investigación en seres humanos (art. 3°, Acuerdo del 23 de octubre de 2000, DOF).

De lo anterior puede enfatizarse que la Comisión Nacional de Bioética era un órgano de consulta sin mayor atribución, lo cual limitaba significativamente su capacidad para influir de manera directa en las prácticas bioéticas dentro del sistema de salud y en las instituciones de investigación científica. Esta naturaleza consultiva, si bien aportaba directrices éticas, reflejaba la intención de establecer una referencia moral más que un mandato regulador, dejando a criterio de las instituciones la adopción y cumplimiento de los principios éticos promovidos por la comisión.

En 2003 se impulsó la creación de las comisiones de bioética de las entidades federativas.

El 7 de septiembre de 2005 Vicente Fox Quesada (Presidente de México 2000-2006) crea por decreto la Comisión Nacional de Bioética como un órgano desconcentrado, de carácter permanente "dotado de autonomía técnica y operativa, la cual tendrá por objeto promover la creación de una cultura bioética en México, fomentar una actitud de reflexión, deliberación y discusión multidisciplinaria y multisectorial de los temas vinculados con la salud humana, y desarrollar normas éticas para la atención, la investigación y la docencia en salud" (art. 1°, Decreto del 7 de septiembre de 2005, DOF).

El ejercicio de derecho comparado entre el Acuerdo que crea la Comisión Nacional de Bioética de 2000 y el Decreto que crea la Comisión Nacional de Bioética de 2005 arroja diferencias significativas que manifiestan un desarrollo en la estructura institucional de la bioética en México. En el Acuerdo de 2000, la Comisión Nacional de Bioética se concibe con un carácter más técnico y vinculado a la Secretaría de Salud, con una integración centrada en las instituciones del sector salud y la academia con el objetivo de dar normas cada vez más completas para la tutela de la dignidad humana en el ámbito de la atención médica y la investigación.

Por otro lado, el Decreto de 2005 supone una evolución tanto en la estructura como en las facultades de la Comisión, dotándola de un carácter más formal y vinculante. La integración pasa de un esquema de representación múltiple a una organización más compacta, con un Consejo que tiene seis consejeros y un presidente, y la inclusión de personalidades distinguidas de la sociedad civil. Las facultades de la Comisión se amplían, subrayándose su papel en la creación de políticas públicas de salud asociadas a la bioética y su rol como órgano consultivo nacional. Además, se refuerza la promoción de comités hospitalarios de bioética y de ética en investigación, resaltando la importancia de la capacitación y el establecimiento de criterios para su funcionamiento (Tabla 1).

Comités de ética en investigación

La primera ley de salud en México fue la del Distrito Federal (hoy Ciudad de México), fechada en 1943.

A nivel federal, la primera Ley General de Salud es de 1984 dada en el sexenio de Miguel de la Madrid Hurtado, en ella se dedicó el título quinto a la Investigación para la salud. Así el artículo 96 enlistó las acciones que contribuyen a la investigación para la salud. En esta ley se sentó por primera vez la obligación para las instituciones de salud de contar con comités de ética.

En la tabla 2 se presenta un ejercicio de derecho comparado con la finalidad de destacar cómo se fue adaptando la legislación en la materia de acuerdo con las necesidades que se evidenciaron al comenzar a instalar los primeros comités de ética en investigación.

A la fecha de redacción de este ensayo, en el portal de internet conbioética-méxico se encuentran dos listas de registros emitidos de comités de ética en investigación en la primera de ellas se reportan 239 comités de instituciones públicas y privadas cuya vigencia fue de 2016 a 2019 (conbioetica-mexico.salud.gob.mx, 2018). La segunda lista presenta 276 comités de ética en investigación de organizaciones públicas y privadas, con registro válidos entre 2016 y 2021 (conbioetica-mexico.salud.gob.mx, 2018).

Comisiones Estatales de Bioética (CEB)

Son organismos consultivos de naturaleza multidisciplinaria e interinstitucional cuyo objetivo es promover la observancia de los principios bioéticos para el respeto de los derechos humanos. Actualmente se cuenta con 26 CEB y corresponden a los Estados de: Baja California, Campeche, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. (Gobierno de México, 2024)

En 2005 la CONBIOÉTICA emitió los lineamientos operacionales para las CEB. En 2011 se volvieron a publicar y esta edición ya contenía normas específicas para su conformación y funcionamiento. (CONBIOÉTICA, 2015) De forma habitual se realiza la evaluación de los lineamientos a través del "Cuestionario de Análisis de Impacto de Lineamientos Operacionales".

Las CEB tienen las atribuciones que en cada entidad federativa le otorga la ley local respectiva, de acuerdo con su decreto de creación y al marco legal de los Servicios Estatales de Salud.

Dentro de las facultades de las CEB están:

- Procurar la observancia de los criterios de bioética a nivel intersectorial en cuestiones relacionadas con la salud.
- Coadyuvar a la consolidación del derecho a la protección de la salud en la investigación para la salud, así como en la prestación de la atención médica.
- Contribuir al desarrollo de políticas públicas de salud vinculadas con la temática bioética.
- Colaborar con la Comisión Nacional de Bioética y en apego estricto a la ley, a fin de promover que en los establecimientos de atención médica del sector público, social o privado del Sistema Nacional de Salud se integren y funcionen Comités Hospitalarios de Bioética, con las funciones que les otorguen las disposiciones jurídicas aplicables.
- Colaborar con la Comisión Nacional de Bioética y en apego estricto a la ley, a fin de promover que en los establecimientos en que se realice investigación con seres humanos se integren y funcionen Comités de ética en investigación, con las funciones que les otorguen las disposiciones jurídicas aplicables.
- Fungir como órgano de consulta y capacitación sobre temas de bioética que sean de su competencia.
- Fomentar la enseñanza de la bioética, particularmente en lo que corresponda a la atención médica y la investigación para la salud.
- Servir de foro para la reflexión interdisciplinaria de temas relacionados a la bioética.
- Suscribir los convenios de colaboración que sean necesarios para el cumplimiento de sus facultades (CONBIOÉTICA, 2015, pp. 11-12).

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

El INSP se crea mediante decreto presidencial el 26 de enero de 1987, como un elemento necesario en el Sistema Nacional de Salud para el goce efectivo del derecho a la protección de la salud. En el INSP se integraron el Centro de Investigación en Salud Pública que se había creado por Acuerdo Secretarial

Table 1. Exercise of law compared between the agreement and the decree that created CONBIOÉTICA.
Tabla 1. Ejercicio de derecho comparado entre el acuerdo y el decreto que crearon la CONBIOÉTICA.

Rubro	ACUERDO que crea la Comisión Nacional de Bioética de 23 de octubre de 2000	DECRETO que crea la Comisión Nacional de Bioética de 7 de septiembre de 2005
Integración	ARTÍCULO TERCERO Titular de la Secretaría de Salud (preside). Director General del Instituto Mexicano del Seguro Social. Director General del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Titular de la Comisión Nacional de Arbitraje México Secretario del Consejo de Salubridad General y Dos representantes de la Secretaría de Salud. Podrán ser invitados a participar: Rector de la Universidad Nacional Autónoma de México; Directores Generales del Instituto Politécnico Nacional y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; dos rectores de universidades de las entidades federativas y dos rectores de universidades privadas; instituciones de investigación, otras dependencias y entidades de la Administración Pública Federal y diversos miembros de la comunidad científica, agrupaciones e instituciones cuya especialidad o fines estén relacionados con el objeto de la Comisión.	ARTÍCULO TERCERO I. Un Consejo. Seis consejeros y un presidente. Podrán ser invitados a participar: Distinguidas personalidades de la sociedad civil y de la comunidad médica (tendrán voz, pero no voto). II. Un director ejecutivo, y III. Las unidades administrativas necesarias para el cumplimiento de su objeto.
Facultades	ARTÍCULO SEGUNDO. Para el cumplimiento de su objeto corresponderá a la Comisión: I. Proponer una guía ética para la atención médica y la investigación;	ARTÍCULO SEGUNDO. Para el cumplimiento de su objeto, corresponderá a la Comisión Nacional de Bioética: **IV.** Coadyuvar para que el derecho a la protección de la salud se haga efectivo en los temas de investigación para la salud, así como en la calidad de la atención médica;
	II. Fijar los criterios o principios éticos mínimos que deberán observarse para la atención médica en las instituciones públicas y privadas de salud;	VIII. Promover que en las instituciones de salud públicas y privadas, se organicen y funcionen comités hospitalarios de bioética y comités de ética en investigación, con las facultades que les otorguen las disposiciones jurídicas aplicables, así como apoyar la capacitación de los miembros de estos comités; IX. Establecer y difundir criterios que deban considerar los comités hospitalarios de bioética y comités de ética en investigación para el desarrollo de sus actividades;
	III. Difundir entre la sociedad y los profesionales, técnicos y auxiliares de la salud los principios y valores que deben regir el ejercicio de su actividad;	III. Identificar y sistematizar los elementos que inciden en una cuestión bioética, a fin de ofrecer información pertinente sobre los mismos a instituciones, grupos sociales o cualquier otro sector interesado;
	IV. Fomentar el respeto de los principios éticos en la actividad médica;	V. Propiciar debates sobre cuestiones bioéticas con la participación de los diversos sectores de la sociedad; X. Organizar y participar en actividades de investigación y de docencia vinculadas con su objeto; XIII. Fomentar la comunicación con universidades, instituciones de educación superior, grupos académicos y de la sociedad civil vinculados con cuestiones bioéticas;
	V. Opinar sobre los protocolos de investigación en seres humanos;	XI. Opinar sobre los protocolos de investigación en salud que se sometan a su consideración;
	VI. Opinar sobre la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, así como su uso correcto en la práctica médica; VII. Dar a conocer los criterios que deberán considerar las comisiones de ética y de bioseguridad de las instituciones de salud;	VI. Fomentar la enseñanza de la bioética, particularmente en lo que toca a la atención médica y la investigación para la salud;
	VIII. Apoyar el desempeño de las comisiones de ética de las instituciones de salud;	VII. Promover la creación de comisiones estatales de bioética;
	IX. Recomendar, en general, los criterios que deberán observarse en la reglamentación de la investigación en seres humanos;	**I.** Establecer las políticas públicas de salud vinculadas con la temática bioética; II. Fungir como órgano de consulta nacional sobre temas específicos de bioética;
	X. Emitir las reglas de operación de la Comisión, y	
	XI. Las demás que le asigne el Ejecutivo Federal.	XV. Las demás atribuciones que le asigne el Secretario de Salud. XII. Suscribir los convenios de colaboración que sean necesarios para el cumplimiento de su objeto; XIV. Procurar la observancia de criterios de bioética a nivel intersectorial en cuestiones relacionadas con la salud en materia de alimentos, agua, medio ambiente, educación, entre otras, y

Table 2. Practice of comparative law on the regulation of Research Ethics Committees and Research Committees.
Tabla 2. Ejercicio de derecho comparado sobre la regulación de los Comités de ética de investigación y Comités de investigación.

Rubro	Ley General de Salud de 1984	DECRETO por el que se adiciona el artículo 41 Bis y se reforma el artículo 98 de la Ley General de Salud.	Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
Comité de ética de investigación	No existe el artículo 41bis	Artículo 41 Bis. Los establecimientos para la atención médica del sector público, social o privado del sistema nacional de salud, además de los señalados en los artículos 98 y 316 de la presente Ley, y de acuerdo con su grado de complejidad y nivel de resolución, contarán con los siguientes comités: II. En los casos de establecimientos de atención médica que lleven a cabo actividades de investigación en seres humanos, un Comité de Ética en Investigación que será responsable de evaluar y dictaminar los protocolos de investigación en seres humanos, formulando las recomendaciones de carácter ético que correspondan, así como de elaborar lineamientos y guías éticas institucionales para la investigación en salud, debiendo dar seguimiento a sus recomendaciones. Los Comités Hospitalarios de Bioética y de Ética en la Investigación se sujetarán a la legislación vigente y a los criterios que establezca la Comisión Nacional de Bioética. Serán interdisciplinarios y deberán estar integrados por personal médico de distintas especialidades y por personas de las profesiones de psicología, enfermería, trabajo social, sociología, antropología, filosofía o derecho que cuenten con capacitación en bioética, siendo imprescindible contar con representantes del núcleo afectado o de personas usuarias de los servicios de salud, hasta el número convenido de sus miembros, guardando equilibrio de género, quienes podrán estar adscritos o no a la unidad de salud o establecimiento.	ARTICULO 99.- En toda institución de salud en donde se realice investigación para la salud, bajo la responsabilidad de los directores o titulares respectivos y de conformidad con las disposiciones aplicables, se constituirán: I. Un Comité de Ética en Investigación en el caso de que realicen investigación en seres humanos; Fracción reformada DOF 02-04-2014 II. Un Comité de Bioseguridad encargado de determinar y normar al interior de la institución el uso de radiaciones ionizantes o de técnicas de ingeniería genética, con base en las disposiciones jurídicas aplicables, y Fracción reformada DOF 02-04-2014 III. Un Comité de Investigación, cuya integración será obligatoria para las instituciones de atención a la salud.
Comité de investigación/ Comité de ética de investigación	ARTICULO 98.- En las instituciones de salud, bajo la responsabilidad de los directores o titulares respectivos y de conformidad con las disposiciones aplicables, se constituirán: una comisión de investigación; una comisión de ética, en el caso de que se realicen investigaciones en seres humanos, y una comisión de bioseguridad encargada de regular el uso de radiaciones ionizantes o de técnicas de ingeniería genética. El Consejo de Salubridad General emitirá las disposiciones complementarias sobre áreas o modalidades de la investigación en las que considere que es necesario.	Artículo 98. En las instituciones de salud, bajo la responsabilidad de los directores o titulares respectivos y de conformidad con las disposiciones aplicables, se constituirán: I. Un Comité de Investigación; II. En el caso de que se realicen investigaciones en seres humanos, un Comité de Ética en Investigación, que cumpla con lo establecido en el artículo 41 Bis de la presente Ley:	

Rubro	Ley General de Salud de 1984	DECRETO por el que se adiciona el artículo 41 Bis y se reforma el artículo 98 de la Ley General de Salud.	Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
	ARTICULO l00.- La investigación en seres humanos se desarrollará conforme a las siguientes bases:	Artículo 100.- La investigación en seres humanos se desarrollará conforme a las siguientes bases:	Título Segundo De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos Arts. 13-27
	I.- Deberá adaptarse a los principios científicos y éticos que justifican la investigación médica, especialmente en lo que se refiere a su posible contribución a la solución de problemas de salud y al desarrollo de nuevos campos de la ciencia médica;	I. Sin cambios	Capítulo II De la investigación en comunidades Arts. 28-33
	II.-Podrá realizarse sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro método idóneo;	II. Sin cambios	Capítulo III De la Investigación en menores de edad o incapaces Arts. 34-39
	III.-Podrá efectuarse sólo cuando exista una razonable seguridad de que no expone a riesgos ni daños innecesarios al sujeto en experimentación:	III. Sin cambios	CAPITULO IV De la investigación en mujeres en edad fértil, embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio, lactancia y recién nacidos; de la utilización de embriones, obitos y fetos y de la fertilización asistida. Arts. 40-56
	IV.-Se deberá contar con el consentimiento por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal en caso de incapacidad legal de aquél, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud;	IV. Se deberá contar con el consentimiento informado por escrito del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal en caso de incapacidad legal de aquél, una vez enterado de los objetivos de la experimentación y de las posibles consecuencias positivas o negativas para su salud;	CAPITULO V De la investigación en grupos subordinados. Arts. 57-58
	V.-Sólo podrá realizarse por profesionales de la salud en instituciones médicas que actúen bajo la vigilancia de las autoridades sanitarias competentes;	V. Sin cambios	
	VI.-El profesional responsable suspenderá la investigación en cualquier momento, si sobreviene el riesgo de lesiones graves, invalidez o muerte del sujeto en quien se realice la investigación, y	VI. El profesional responsable suspenderá la investigación en cualquier momento, si sobreviene el riesgo de lesiones graves, discapacidad, muerte del sujeto en quien se realice la investigación;	
	VII.-Las demás que establezca la correspondiente reglamentación.	VII. Es responsabilidad de la institución de atención a la salud proporcionar atención médica al sujeto que sufra algún daño, si estuviere relacionado directamente con la investigación, sin perjuicio de la indemnización que legalmente corresponda, y VIII. Las demás que establezca la correspondiente reglamentación.	

en 1984 y que tenía como objetivo "contribuir, a través de la investigación y la docencia de alto nivel, al conocimiento y control de los problemas de salud prioritarios, al desarrollo de la salud pública y al diseño de formas racionales de organización de servicios de salud" (DOF, 26/01/1987); el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas establecido por Acuerdo Secretarial también de 1984 con el objetivo de "desarrollar e impulsar las investigaciones y formar recursos humanos en el campo de las enfermedades transmisibles" (Ídem) y la Escuela de Salud Pública de México que tuvo como antecedente la Escuela de Salubridad creada en 1922 (Gudiño *et al*., 2013). La Escuela de Salud Pública de México se encargaba de "planear, organizar y realizar, de acuerdo con las necesidades del Sistema Nacional de Salud, programas de formación y desarrollo de recursos humanos a nivel técnico, superior y de posgrado en los campos de la salud pública" (Ídem).

De los objetivos del INSP destacan: Promover que se realice investigación en salud pública y en infectología, así como difundir los resultados en coordinación con oficinas del Sector Salud, planear, realizar y evaluar investigaciones en materia de salud pública y la infectología, que lleven al incremento del conocimiento de los problemas de salud que son prioritarios, así como diseñar métodos y técnicas de investigación científica aplicables a los estudios relacionados con la salud.

El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT)

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) se crea en 1970 como organismo público descentralizado, integrante del sector educativo, con personalidad jurídica y patrimonio propio. Se constituyó para promover y robustecer el desarrollo científico y la modernización tecnológica de México. En 2023 la Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación transforma el nombre del CONACYT a CONAHCyT para evidenciar la importancia de la investigación en Humanidades. En la misma ley se constituyó el Sistema Nacional de Centros Públicos a cargo del CONAHCyT y al cual se integraron 27 Centros Públicos de Investigación: Centro de Investigación en Ciencias de Información Geoespacial (CentroGeo), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC), Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Centro de Tecnología Avanzada A. C. (CIATEQ), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Centro de Investigación y Docencia Económicas A. C. (CIDE), Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI), Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social (CIESAS), Centro de Investigación en Matemáticas A. C. (CIMAT), Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. (CIMAV), Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. (CIO), Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), El Colegio de la Frontera Norte (COLEF), El Colegio de Michoacán (COLMICH), El Colegio de San Luis A. C. (COLSAN), Corporación Mexicana de Investigación en Materiales S. A. de C. V. (COMIMSA), El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO), Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), Instituto de Ecología (INECOL), Centro de Investigación e Innovación en Tecnologías de la Información y Comunicación (INFOTEC), Instituto Mora, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT).

Este Sistema Nacional de Centros Públicos se concretó para articular los recursos, infraestructuras y redes de los Centros Públicos, con el objeto de contribuir con sus capacidades al diseño, ejecución y evaluación de actividades, programas y proyectos en materia de humanidades, ciencias, tecnologías e innovación relacionados con las áreas estratégicas o prioritarias del desarrollo nacional y los temas de interés público nacional o de atención indispensable considerados en la Agenda Nacional, a fin de alcanzar y consolidar la independencia científica y tecnológica del país… (Artículo 75, párrafo primero).

Antes de conformar el actual Sistema de Centros Públicos estas instituciones de enseñanza e investigación eran denominados Centros SEP-Conacyt y ya eran considerados como un sistema desde 1992 (Subsector Ciencia y Tecnología del Sector de Educación Pública). En ese mismo año pasan de estar a cargo de la Secretaría de Programación y Presupuesto a incorporarse al CONACyT. En 2000 se emite el Acuerdo por el que se reconocen diversas entidades paraestatales del Sistema SEP-CONACYT, como Centros Públicos de Investigación (17 en total en el año 2000). Es decir, a estos Centros se les da el trato de entidades paraestatales. En 2003 se publica el Acuerdo por el que se *resectorizan* las Entidades Paraestatales que integran el Sistema de Centros Públicos CONACYT, en el sector coordinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Todas las instituciones que componen el Sistema de Centros Públicos cuentan con Comité de Ética y de Prevención de Conflictos de Interés y tienen Comité de Ética en investigación el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (CIAD), El Colegio de la Frontera Norte (COLEF) y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), de acuerdo con las declaraciones que hacen en sus páginas de internet. En el listado actual de registros emitidos de Comités de Ética en Investigación, no aparecen los centros públicos de investigación incorporados en 2023 al Sistema Nacional de Centros Públicos a cargó del CONAHCyT; sí están inscritas otras 151 IES, hospitales públicos federales y estatales (CONBIOÉTICA, 2024).

Legislación aplicable a la ética y bioética de la investigación científica

La legislación aplicable a la ética y bioética de la investigación científica en nuestro sistema jurídico tiene su sustento en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

(CPEUM). La Ley General de Salud y los reglamentos que de ella emanan, deben su existencia al artículo 4° de la CPEUM.

A nivel supranacional, desde su incorporación a la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 1945, México ha asumido el compromiso de adherirse y cumplir con los diversos tratados y convenciones internacionales que garantizan la dignidad humana y protegen los derechos fundamentales.

A partir de la conclusión de la Segunda Guerra Mundial, como se asentó en la introducción de este trabajo, las normas para la ética y la bioética de la investigación científica comenzaron a establecerse en 1947, año en que se concretó el Código de Nüremberg que incluye diez principios que debían regir a las investigaciones científicas en materia de salud: el consentimiento informado del sujeto de experimentación, la beneficencia del experimento, la formulación ética y bioética del experimento y su impacto en la dignidad humana (Ferrer y Pastor, 1999). En 1948 se emitió la Declaración Universal de los Derechos Humanos en donde se enfatizó que la dignidad es propia de todos los seres humanos por lo que se prohibió la tortura, los tratos crueles, inhumanos o degradantes (artículo 5), así como el respeto de los derechos inherentes a la naturaleza humana.

Fue en 2005 que la Conferencia General de la UNESCO formuló la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos buscando con ello fortalecer el compromiso de las Naciones firmantes para realizar acciones concretas a favor de la ética y la bioética en la práctica médica, las ciencias de la vida y las tecnologías ligadas a ellas y que se utilizan en los seres humanos (artículo 1°). Esta Declaración retoma los principios del Código de Nüremberg. En el artículo 3° se asienta la responsabilidad compartida de respetar la dignidad humana y el bienestar de la persona que debe prevalecer sobre el interés de la ciencia y de la propia sociedad. El artículo 19 promueve la creación de los comités de ética para: "a) evaluar los problemas éticos, jurídicos, científicos y sociales pertinentes suscitados por los proyectos de investigación relativos a los seres humanos; b) prestar asesoramiento sobre problemas éticos en contextos clínicos; c) evaluar los adelantos de la ciencia y la tecnología, formular recomendaciones y contribuir a la preparación de orientaciones sobre las cuestiones que entren en el ámbito de la presente Declaración; d) fomentar el debate, la educación y la sensibilización del público sobre la bioética, así como su participación al respecto" (UNESCO, 2006).

Es importante señalar que, si bien en junio de 2011 se reformó la Constitución mexicana insertando el término "derechos humanos", así como los principios pro-persona y de convencionalidad en el artículo 1°, al poco tiempo se denunció la Contradicción de Tesis 293/2011 que se resolvió 2013 estableciendo que los tratados internacionales de derechos humanos de los que México sea parte tienen igual forma normativa que las normas de la Constitución federal; aunque prevalecen restricciones y limitaciones de derechos humanos que pudiera haber en esta última, pues no hay una relación jerárquica entre las normas de derechos humanos de carácter supranacional y las normas nacionales. Este criterio, llegado el caso, aplicaría también para el tema que nos ocupa, salvo que se establezca una nnueva pauta.

Declaración de Helsinki

La Declaración de Helsinki, formulada por la Asociación Médica Mundial en 1964, surgió como una respuesta a los abusos éticos cometidos en la investigación médica durante la Segunda Guerra Mundial y fue influenciada por el Código de Núremberg. El uso de la talidomida en la década de 1950 y que causó la muerte de muchos bebés que nacieron con anormalidades porque sus madres habían ingerido este medicamento para tratar molestias del resfriado común, también fue un factor determinante para que la Asociación Médica Mundial planteara este documento. (Cancino *et al*., 2019) Desde su creación, la Declaración es revisada y actualizada cada 8 años, siendo la última revisión en octubre de 2024 y cuya versión definitiva aún no está disponible. Esta Declaración se enfoca en principios bioéticos fundamentales como la autonomía, la beneficencia, la justicia y la no maleficencia. Además de enunciar principios éticos, la Declaración subraya la necesidad de contar con comités de ética en investigación que supervisen los ensayos clínicos para garantizar que se cumplan los protocolos instaurados. Es requisito para los investigadores informar cualquier incidente adverso significativo y presentar un informe final que incluya resultados positivos y negativos, promoviendo así la transparencia en la investigación (WMA, 2024).

En México, la Declaración de Helsinki es un pilar de la regulación en investigación en salud, influyendo en la Ley General de Salud y su reglamento, los cuales retoman sus principios para asegurar que la investigación se realice bajo estándares éticos y científicos. Por ejemplo, el Artículo 100 de esta Ley estipula que los estudios deben seguir principios éticos y científicos rigurosos y evitar riesgos inútiles para los sujetos de investigación. Esto evidencia el compromiso con la protección de la autonomía y los derechos de los participantes. En este contexto, la implementación de los principios de la Declaración es esencial, particularmente en investigaciones que deben alinearse con las necesidades de la población y considerar las características de los grupos vulnerables. Además, el incorporar recomendaciones sobre la divulgación de conflictos de interés en el consentimiento informado fortalece la ética de la investigación, asegurando que los participantes cuenten con la información completa para tomar decisiones conscientes sobre su participación en los estudios (CONBIOÉTICA, 2013).

Pautas éticas CIOMS

Las Pautas Éticas desarrolladas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) constituyen un conjunto de 25 lineamientos fundamentales para asegurar prácticas éticas en la investigación biomédica en seres humanos. Estas directrices surgieron en respuesta a la exigencia de proteger a los participantes de investigación, especialmente tras eventos históricos que pusieron en evidencia abusos en estudios clínicos, como el citado caso

de Tuskegee. Concebidas en la década de 1980, las Pautas CIOMS han sido actualizadas de manera periódica para responder a los avances en la ética de la investigación y adaptarse a las inquietudes emergentes. Están fundamentadas en principios éticos básicos como el respeto por las personas, la beneficencia, la justicia y la no maleficencia, asegurando que la investigación se realice con un alto nivel de integridad y respeto por los derechos humanos.

Entre los principios esenciales que promueven las Pautas CIOMS, el consentimiento informado destaca como una obligación de los investigadores para garantizar que los participantes reciban toda la información relevante de manera comprensible y que consientan participar sin coacción. Asimismo, las directrices subrayan la importancia de la confidencialidad, instando a implementar mecanismos para proteger la privacidad y los datos personales de los participantes. También se establece que toda investigación debe ser sometida a una evaluación por comités de ética independientes, cuyo papel es salvaguardar los derechos y el bienestar de los sujetos de estudio, además de verificar que los estándares éticos se mantengan en cada fase del proyecto (OPS-CIOMS, 2017).

En México, las Pautas CIOMS encuentran su aplicación a través de la legislación nacional, que incluye la Ley General de Salud y diversas Normas Oficiales Mexicanas que se abordan a continuación y que regulan la investigación en seres humanos. Las instituciones de salud y educativas deben seguir estas pautas en el desarrollo de sus proyectos, asegurando el respeto a la dignidad y los derechos de los participantes. Los comités de ética en investigación del país desempeñan un rol crucial en la revisión y aprobación de estudios, verificando que los lineamientos éticos dispuestos por las Pautas CIOMS se respeten y se apliquen de manera adecuada. En este sentido, las Pautas CIOMS son una herramienta fundamental para promover la protección de los participantes y mantener la integridad en los estudios científicos. Su implementación en México está en sintonía con las regulaciones nacionales, construyendo un marco ético robusto que apoya la transparencia y la responsabilidad en la investigación biomédica.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud

Este Reglamento fue dado en 1987 para la observancia de la Ley General de Salud que en los artículos 2, 41 Bis, 68, 73, 96 al 103 (Título Quinto: Investigación para la salud), entre otros; para ordenar las acciones de investigación para la salud sujetándolas a principios éticos, científicos y a normas de seguridad para los seres humanos.

Es de señalar que la Ley General de Salud no indica textualmente que las Instituciones de Educación Superior (IES) estén sujetas a su normatividad, sin embargo, al ser su finalidad proteger el derecho a la salud de todas las personas es que decreta en su artículo 2° que una de las finalidades de esa protección lo constituye "El desarrollo de la enseñanza y la investigación científica y tecnológica para la salud" (fracc. VII), así como lo sentenciado por el artículo 3°: "es materia de salubridad general: IX. La coordinación de la investigación para la salud y el control de ésta en los seres humanos" es decir, que se impone el principio del interés público, de ahí que las IES estén obligadas conforme a los lineamientos de la normativa señalada y deba cumplir con los requisitos que se imponen a todas aquellas instituciones que tengan que ver con la investigación en materia de salud, entre los que destacan contar con comités de ética y bioética para la vigilancia de las investigaciones que impactan en la dignidad humana así como en los derechos de las personas.

El Reglamento aborda en su título segundo los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, destacando que el criterio del respeto a la dignidad y la protección de los derechos y bienestar de los seres humanos debe prevaler en toda investigación en donde estos sean sujeto de estudio (artículo 13).

Se define el riesgo que pueda sufrirse en la investigación como "la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio" (artículo 17), por lo que en función de ello se determinaron tres tipos de investigación: investigación sin riesgo, investigación con riesgo mínimo e investigación con riesgo mayor que el mínimo.

Se considerará investigación sin riesgo aquellas que se fundan en cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos. (fracción I, artículo 17) Es investigación con riesgo mínimo aquella que realiza estudios exploratorios que utilizan el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios (fracción II, artículo 17) Se le denomina investigación con riesgo mayor que el mínimo, aquella en la que existen grandes probabilidades de afectar al sujeto de estudio por hacer "estudios radiológicos y con microondas, ensayos con los medicamentos y modalidades que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, ensayos con nuevos dispositivos, estudios que incluyan procedimientos quirúrgicos, extracción de sangre mayor al 2% del volumen circulante en neonatos, amniocentesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores" (fracción III, artículo 17).

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, también define el consentimiento informado, las investigaciones en comunidades, investigación en menores de edad o incapaces. Regula la investigación en Mujeres en Edad Fértil, Embarazadas, durante el Trabajo de Parto, Puerperio, Lactancia y Recién Nacidos; de la utilización de Embriones, Óbitos y Fetos y de la Fertilización Asistida. De igual forma regla la investigación en grupos subordinados como podrían ser conjuntos de estudiantes, trabajadores, internos de reclusorios, entre otros; investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos, investigación de nuevos recursos profilácticos, de diagnósticos, terapéuticos y de rehabilitación; investigación farmacológica. En materia de bioseguridad, este Reglamento aborda la investigación con microorganismos patógenos o material Biológico que pueda contenerlos, investigación que implique construcción

y manejo de ácidos nucleicos recombinantes, investigación con isótopos radiactivos y dispositivos y generadores de radiaciones ionizantes y electromagnéticas.

El multicitado reglamento establece la obligatoriedad de los comités internos de ética, de bioseguridad y de investigación en las instituciones de salud donde se realice investigación para la salud. Además, regula la ejecución de la investigación en las instituciones de atención a la salud, indicando la obligatoriedad de contar con un protocolo de investigación.

Por último, aborda la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación y en general, las medidas de seguridad.

Normas Oficiales Mexicanas

En el sistema jurídico mexicano las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs) son regulaciones de carácter técnico, fundadas en información científica y tecnológica que buscan ordenar actividades claves para la industria en diferentes áreas promoviendo el respeto de los derechos humanos. Las NOMs "son aplicables a productos, procesos, sistemas, actividades, servicios o métodos de producción y determinan cómo deben realizarse los productos, procesos y servicios que se utilizan cotidianamente" (Secretaría de Economía, 2021). El gobierno de México actúa como autoridad normalizadora identificando los riesgos y emitiendo las NOMs para prevenirlos. Este tipo de normas son aplicables al ámbito público y privado.

En materia de ética y bioética en nuestro país se cuenta con las NOM-012-SSA3-2012 y NOM-004-SSA3-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012

Conserva los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Para su elaboración se convocó a representantes del sector salud del orden público y privado encabezados por la Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud y el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación.

La NOM-012-SSA3-2012 instaura los lineamientos legales de carácter administrativo, ético y metodológico, que fundados en la Ley General de Salud y el Reglamento en materia de investigación para la salud, "son de observancia obligatoria para solicitar la autorización de proyectos o protocolos con fines de investigación, para el empleo en seres humanos de medicamentos o materiales, respecto de los cuales aún no se tenga evidencia científica suficiente de su eficacia terapéutica o rehabilitadora o se pretenda la modificación de las indicaciones terapéuticas de productos ya conocidos, así como para la ejecución y seguimiento de dichos proyectos" (DOF, 4 de enero de 2013).

Esta NOMs es fundamental para la dirección de los procesos de investigación para la salud humana, en ella se definen los términos: atención médica, autorización de una investigación para la salud en seres humanos, carta de consentimiento informado en materia de investigación, comités en materia de investigación para la salud, efecto adverso, enmienda, evidencia científica suficiente, informe anual, informe técnico final, informe técnico parcial, institución o empresa donde se realiza investigación para la salud, investigación para la salud en seres humanos, investigador principal, lex artis médica, maniobra experimental, medicamentos o materiales, modificación, patrocinador, procedimiento invasivo, proyecto o protocolo de investigación para la salud en seres humanos y sujeto de investigación.

También indica los requisitos para presentación y autorización de los proyectos o protocolos de investigación, el seguimiento de la investigación y de los informes técnico-descriptivos, las instituciones o establecimientos donde se realiza una investigación, la constitución, inscripción y funcionamiento de los Comités de Investigación, Ética en la Investigación y Bioseguridad, el investigador principal, la seguridad física y jurídica del sujeto de investigación, la información implicada en investigaciones y la concordancia con normas internacionales y mexicanas.

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012

Esta norma está dedicada al expediente clínico que por su importancia determina "los criterios científicos, éticos, tecnológicos y administrativos obligatorios en la elaboración, integración, uso, manejo, archivo, conservación, propiedad, titularidad y confidencialidad del expediente clínico, el cual se constituye en una herramienta de uso obligatorio para el personal del área de la salud, de los sectores público, social y privado que integran el Sistema Nacional de Salud" (DOF, 15 de octubre de 2012).

El expediente clínico es una manifestación del derecho humano a la salud, así como del derecho a la protección de datos personales, los cuales son parte del patrimonio de las personas por lo que se requiere un marco específico de regulación. Es por eso por lo que la integralidad del expediente clínico debe ser respetada por los sujetos obligados (públicos y privados) y tutelado por las autoridades.

La relevancia de esta NOM es tal que para su interpretación y aplicación deben consultarse dieciséis NOMs, a saber: Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos; 2. Norma Oficial Mexicana NOM-005-SSA2-1993, De los servicios de planificación familiar; 3. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud; 4. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA3-2011, Para la práctica de anestesiología; 5. Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio; 6. Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana; 7. Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-2006, Para la prevención y control de enfermedades bucales; 8. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino; 9. Norma Oficial Mexicana NOM-

015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria; 10. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, Para la vigilancia epidemiológica; 11. Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA2-1994, Para la prestación de servicios de salud en unidades de atención integral hospitalaria médico-psiquiátrica; 12. Norma Oficial Mexicana NOM-028-SSA2-2009, Para la prevención, tratamiento y control de las adicciones; 13. Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño; 14. Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA2-2004, En materia de información en salud; 15. Norma Oficial Mexicana NOM-046-SSA2-2005, Violencia familiar, sexual y contra las mujeres. Criterios para la prevención y atención; 16. Norma Oficial Mexicana NOM-206-SSA1-2002, Regulación de los servicios de salud. Que dispone los criterios de funcionamiento y atención en los servicios de urgencias de los establecimientos de atención médica.

La NOM-004-SSA3-2012 define conceptos técnicos como: atención médica, cartas de consentimiento informado, establecimiento para la atención médica, expediente clínico, hospitalización, interconsulta, paciente, pronóstico, referencia-contrarreferencia, resumen clínico, urgencia y usuario. Todo ellos impactan el derecho humano a la salud que es multifactorial pues implica la accesibilidad a las clínicas u hospitales, bienes como medicamentos, vacunas, entre otros y servicios sanitarios como serían la atención médica, rehabilitación, cirugías, medicamentos, vacunas, bancos de sangre; todo ellos sin discriminar a las personas. Además, de ser accesibles, tienen que estar disponibles para todos aquellos que los requieran; deben ser aceptables en cuanto que estén apegados a la ética médica y se manejen con protocolos que respeten la dignidad de la persona y la variabilidad cultural. Por último, deben ser de buena calidad como garantía de realización del derecho a la salud (DOF, 29 de junio de 2012).

Las cartas de consentimiento informado y la interconsulta se relacionan además con el derecho al libre desarrollo de la personalidad.

El libre desarrollo de la personalidad tiene una dimensión externa y una interna. Desde una perspectiva externa, el derecho comprende una amplia libertad de ejercicio que permite realizar cualquier actividad con el fin de que cada individuo pueda desarrollar su personalidad. Por otro lado, desde su dimensión interna, el derecho delimita una "esfera de privacidad" que protege al individuo de las intromisiones externas que puedan restringir su posibilidad de tomar decisiones (Salgado, 2022).

Este derecho es de índole personalísimo e implica la dignidad humana por la cual las personas pueden tomar sus decisiones de manera libre, de acuerdo con su proyecto de vida. Por lo anterior es que ningún tercero puede imponerles su voluntad afectando su autonomía. Así, en el caso del derecho a la salud y frente a diagnósticos médicos que impliquen cirugías o tratamientos médicos agresivos, invasivos, de largo alcance o incluso de carácter experimental, el paciente tiene el derecho de tomar la determinación que considere más adecuada para su plan personal.

A su vez, el expediente y el resumen clínicos se relacionan con el derecho a la protección de datos personales que incluye los llamados derechos ARCO (derechos de Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición de los datos personales).

Según la NOM-004-SSA3-2012 el expediente clínico es el conjunto único de información y datos personales de un paciente, que se integra dentro de todo tipo de establecimiento para la atención médica, ya sea público, social o privado, el cual, consta de documentos escritos, gráficos, imagenológicos, electrónicos, magnéticos, electromagnéticos, ópticos, magneto-ópticos y de cualquier otra naturaleza, en los cuales, el personal de salud deberá hacer los registros, anotaciones, en su caso, constancias y certificaciones correspondientes a su intervención en la atención médica del paciente, con apego a las disposiciones jurídicas aplicables (DOF, 15 de octubre de 2012).

El contenido del expediente clínico es considerado de carácter confidencial pues los datos personales que en él se conservan está tutelados por el derecho, e inclusive pueden constituir parte del patrimonio intangible del paciente en su modalidad de datos personales, como por ejemplo en el caso de información genética (dimensión individual) de ahí que tengan que protegerse y mantenerse en secrecía. La Suprema Corte de Justicia de la Nación ha declarado que el expediente clínico es un documento de naturaleza privada que está regulado de forma especial en la ley (Tesis: I.4o.C.154 C, Registro digital: 168924, 2008) y porque su contenido es un "diario" de la salud de su titular.

Los argumentos anteriores son válidos para el resumen clínico que es el "documento elaborado por un médico, en el cual, se registran los aspectos relevantes de la atención médica de un paciente, contenidos en el expediente clínico. Deberá tener como mínimo: padecimiento actual, diagnósticos, tratamientos, evolución, pronóstico y estudios de laboratorio y gabinete" (NOM-004-SSA3-2012, DOF, 15 de octubre de 2012).

La investigación científica en la Universidad Nacional Autónoma de México

La Universidad Nacional Autónoma de México es el referente por excelencia de la investigación científica en este país. La institución nace formalmente en 1910 al aglomerarse las escuelas Nacional Preparatoria, de Jurisprudencia, de Medicina, de Ingenieros, de Bellas Artes y de Altos Estudios, aunque fue declarada autónoma hasta 1929 (unam.mx).

Una vez concluida la etapa de la Revolución Mexicana, algunos grupos de profesionistas mexicanos se dieron a la tarea de reconstruir el tejido educativo necesario para impulsar el desarrollo del país, impulsando la consolidación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UAM) como la conocemos actualmente.

La formalización de la UNAM como cuna de la investigación científica en México se dio a partir de la creación de los

distintos institutos y centros especializados que fueron por mucho tiempo y siguen siéndolo, los referentes en la materia. Actualmente, la UNAM cuenta con 37 institutos dedicados a la investigación científica.

En la tabla 3 puede observarse cómo a través de los años se fue concretando la investigación científica de la UNAM.

Table 3. UNAM research institutes.
Tabla 3. Los institutos de investigación de la UNAM.

Instituto	Año de creación	Denominación anterior
Instituto de Geología (IGL)	1882	Instituto Geológico de México
Instituto de Biología (IB)	1929	
Instituto de Investigaciones Sociales (IIS)	1930	
Instituto de Investigaciones Estéticas	1935	Laboratorio de Arte
Instituto de Física (IF)	1938	
Instituto de Investigaciones Jurídicas (IIJ)	1940	Instituto de Derecho Comparado
Instituto de Neurobiología	1940	
Instituto de Investigaciones Económicas	1940	
Instituto de Investigaciones Filosóficas	1940	Centro de Estudios Filosóficos
Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB)	1941	Laboratorio de Estudios Médicos y Biológicos
Instituto de Química	1941	
Instituto de Matemáticas	1942	
Instituto de Geografía (IGg)	1943	
Instituto de Geofísica (IGEF)	1945	
Instituto de Investigaciones Históricas	1945	
Instituto de Ingeniería (II)	1956	
Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS)	1958	Centro de Cálculo Electrónico de la Facultad de Ciencias
Instituto de Investigaciones Antropológicas	1963	Sección de Antropología del Instituto de Investigaciones Históricas
Instituto de Astronomía de la UNAM (IA)	1967	Observatorio Astronómico Nacional
Instituto de Ciencias Nucleares (ICN)	1967	Laboratorio Nuclear
Instituto de Investigación en Materiales	1967	Centro de Materiales
Instituto de Investigaciones Bibliográficas (IIB)	1967	
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT)	1971	Centro de Instrumentos
Instituto de Fisiología Celular (IFC)	1973	
Instituto de Investigaciones Filológicas	1973	
Instituto de Investigaciones sobre la Universidad y la Educación (IISUE)	1976	Centro de Estudios sobre la Universidad
Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático (ICAyCC)	1977	Centro de Ciencias de la Atmósfera
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL)	1981	
Instituto de Biotecnología (IBt)	1982	Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología
Instituto de Energías Renovables (IER)	1985	Laboratorio de energía solar (1985-1996), Centro de Investigación en Energía (1996-2013)
Centro de Investigaciones Multidisciplinarias Sobre Chiapas y la Frontera Sur	1985	Centro de Investigaciones Humanísticas de Mesoamérica y el Estado de Chiapas (CIHMECH)
Instituto de Ecología	1988	Centro de Ecología
Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES)	1996	Departamento de Ecología y Recursos Naturales (DERN) del Instituto de Ecología
Instituto de Ciencias Físicas (ICF)	1998	Centro de Ciencias Físicas
Instituto de Geociencias	2002	Centro de Geociencias
Instituto de Radioastronomía y Astrofísica	2003	Centro de Radioastronomía y Astrofísica (CRyA)
Instituto de Investigaciones Bibliotecológicas y de la Información (IIBI)	2012	

En 2024 la UNAM cuenta con 42,615 profesores con las designaciones de: profesor de carrera, investigadores, técnicos académicos en docencia, técnicos académicos en investigación, profesores de asignatura, ayudante de profesor, ayudante de investigador, profesor e investigador visitante, profesor e investigador emérito. Del total de profesores 6,361 pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores del CONAHCyT (Portal de Estadística UNAM, 2024).

La UNAM es la universidad pública con el mayor presupuesto en México y la que más invierte en investigación (26.2 %). Esto es para reflexionarse dado que el gobierno mexicano no ha aumentado de forma significativa el gasto en investigación los últimos años y que en el Presupuesto de Egresos de la Federación aparece bajo el rubro Presupuesto Público Federal para la Función Ciencia, Tecnología e Innovación: 0.30 % del PIB en 2020, 0.38 del PIB en 2021, 0.20 % del PIB en 2022, 0.38 % del PIB en 2023 y 0.36 % del PIB en 2024 (diputados.gob.mx); lo que no cumplió en su momento con lo establecido en el artículo 9 BIS de la Ley de Ciencia y Tecnología y que a letra señalaba que "el gasto nacional en este rubro no podrá ser menor al 1% del producto interno bruto del país". (diputados.gob.mx) Esta ley fue abrogada el 8 de mayo de 2023 por la Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación en la que sólo se indica que el "monto anual que se destine a la investigación humanística y científica, el desarrollo tecnológico y la innovación no podrá ser inferior a lo aprobado en el ejercicio inmediato anterior" (Artículo 30, último párrafo). En la tabla 4 se aprecia el presupuesto de egresos de la UNAM correspondiente a los años 2000, 2004, 2014 y 2024, así como las áreas en que se divide, destacando cómo ha crecido, permitiéndole mantenerse a la vanguardia en desarrollo académico e investigación.

Además de la UNAM existen otras Instituciones de Educación Superior públicas y privadas que realizan investigación, como el Instituto Politécnico Nacional creado en 1936 y que cuenta actualmente con veinte centros de investigación y veinte secciones de estudio de posgrado e investigación. Algunas Secretarías de Estado también realizan investigación como por ejemplo, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación que tiene dos colegios, dos comisiones y un instituto nacional de investigaciones; la Secretaría de Salud que cuenta con diez centros nacionales, cuatro comisiones nacionales, un consejo nacional, nueve hospitales, el sistema del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), el sistema del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), doce institutos nacionales, Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A de C.V. y Servicios de Atención Psiquiátrica.

En el ámbito de las Instituciones de Educación Superior Privadas, son pocas las que realizan investigación científica pues esto implica una importante inversión económica para contar con la infraestructura y bienes necesarios para formar sus cuadros de investigadores y desarrollar líneas de investigación. El QS World University Rankings 2025 enlista a 12 universidades privadas mexicanas que poseen con una red de investigación: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Universidad Panamericana, Instituto Tecnológico Autónomo de México, Universidad Anáhuac México, Universidad Iberoamericana México, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, Universidad de las Américas Puebla, Universidad Autónoma de Guadalajara, Universidad de Monterrey, Universidad La Salle, Universidad del Valle de México y Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (QS Topuniversities, 2025).

Comités de ética en investigación en instituciones de educación superior (IES)

Los comités de ética en investigación en las IES son de creación reciente pues la investigación no ha sido una prioridad en la mayoría de ellas (INCyTU, 2018). Las IES mexicanas se enfocan en la transmisión del conocimiento más que en la generación de este. Ello puede constatarse con la falta de inversión en el país para generar soluciones a los problemas que enfrenta a través de las IES.

Al respecto, la Secretaría de Economía señala que de 1999 a 2023 la inversión extranjera directa en Servicios de Investigación Científica y Desarrollo fue de US$240M. Según el Banco Mundial el gasto en investigación y desarrollo de México en 2020 correspondió al 0,3 % del PIB, frente al 3.14% de Alemania y el 4.93% de la República de Corea. Deben tomarse en cuenta dos variables relevantes: la pandemia Covid-19 y la negativa presidencial de impulsar la investigación con la consecuente intervención al Sistema Nacional de Investigadores y a todo el sistema de ciencia y tecnología (Figura 1).

La Universidad Nacional Autónoma de México cuenta actualmente con 96 comités de ética y de bioética en investigación en los distintos Centros, Facultades, Facultades de Estudios Superiores, Escuelas Nacionales, Escuelas Nacionales de Estudios Superiores, Institutos y Centros tal como se muestra en la tabla 5.

Los esfuerzos que las IES están haciendo para formalizar sus comités de ética y bioética habla de su compromiso por atender debidamente los lineamientos para la realización

Table 4. UNAM. Expenses Budget.
Tabla 4. UNAM. Presupuesto de egresos.

	2000	2004	2014	2024
Total	10,686,631,573	16,456,140,562	35,584,146,143	55,959,055,956
Docencia	6,435,152,351	9,835,832,236	21,964,531,804	34,531,509,163
Nivel superior	4,945,009,969	7,496,737,023	17,045,191,198	27,139,457,946
Nivel bachillerato y técnico	1,490,142,382	2,339,095,213	4,919,340,606	7,392,051,217
Investigación	2,567,822,326	4,155,287,017	9,061,644,867	14,640,689,626
Extensión universitaria	927,976,677	1,303,826,758	2,763,110,824	4,242,588,731
Gestión institucional	755,680,219	1,161,194,551	1,794,858,648	2,544,268,436



Figura 1. Gasto en investigación y Desarrollo (% del PIB) en México, República de Corea y Alemania.
Figure 1. Research and development spending (% of GDP) in Mexico, Republic of Korea and Germany.

Table 5. Ethics committees of the different Faculties, Centers and Institutions of the Universidad Nacional Autónoma de México.
Tabla 5: Comités de ética de las diversas Facultades, Centros e Institutos de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Número	Facultad/Centro/Instituto	Comité de Ética
1	Facultad de Arquitectura	Comité de Ética de la Facultad de Arquitectura
2	Facultad de Artes y Diseño	Comité de Ética de la Facultad de Artes y Diseño
3	Facultad de Ciencias	Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias
4	Facultad de Ciencias Políticas y Sociales	Comité de Ética en Investigación y Docencia
5	Facultad de Contaduría y Administración	Comité de Ética en Investigación y Docencia
6	Facultad de Derecho	Comité de Ética de la Facultad de Derecho, UNAM
7	Facultad de Enfermería y Obstetricia	Comité de Ética en Investigación
8	Facultad de Filosofía y Letras	Comité de Ética de Docencia e Investigación
9	Facultad de Ingeniería	Comité de Ética de la Facultad de Ingeniería
10	Facultad de Medicina	Comisión de Bioseguridad
11		Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)
12		Comité de Ética de la Investigación
13	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	Comité de Ética Clínica (CEC)
14		Comité de Ética e Integridad Académica y Científica (CEIAC)
15		Comité Interno para Uso y Cuidado de los Animales
16		Comité Interno para el Manejo de Residuos Peligrosos (CIMARPE)
17		Comité Interno de Bioseguridad (CIB)
18	Facultad de Música	Comité de Ética de Investigación de la FAM
19	Facultad de Odontología	Comité de Investigación y Ética
20		Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
21		Comisión de Bioseguridad
22	Facultad de Psicología	Comité de Ética de la Investigación
23		Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
24		Comité de Bioseguridad / Manejo Adecuado de Residuos

Número	Facultad/Centro/Instituto	Comité de Ética
25	Facultad de Química	Comité de Ética en Investigación y Docencia
26	Facultad de Estudios Superiores Acatlán	Comité de Ética en Investigación y Docencia
27	Facultad de Estudios Superiores Aragón	Comité de Integridad Académica y Científica
28	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán	Comité Multidisciplinario de Ética en Investigación y Docencia
29	Facultad de Estudios Superiores Iztacala	Comité de Ética en Investigación y Docencia
30	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza	Comité de Ética sobre Investigación
31		Comité de Ética sobre Gestión
32		Comité de Ética sobre Docencia
33	Escuela Nacional de Artes Cinematográficas	Comité de Ética en Investigación y Docencia
34	Escuela Nacional de Ciencias de la Tierra	Comité de Ética de la Escuela Nacional de Ciencias de la Tierra
35	Escuela Nacional de Lenguas, Lingüística y Traducción	Comité de Ética de la ENALLT
36	Escuela Nacional de Trabajo Social	Comité de Ética en la Investigación
37	ENES León	Comité de Integridad Académica y Científica
38		Comité de Bioseguridad
39		Comité de Investigación
40	ENES Mérida	Comité de Ética en Investigación y Docencia
41	ENES Morelia	Comité de Ética de la ENES Unidad Morelia
42	Instituto de Astronomía	Comité de Ética e Integridad Científico-Académico
43	Instituto de Biología	Comité de Ética en Investigación y Docencia
44	Instituto de Biotecnología	Comité de Ética e Integridad Científica
45		Comité de Bioética
46		Comisión Interna de Bioseguridad
47	Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología	Comité de Ética del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología
48	Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático	Comité de Ética de Investigación y Docencia
49	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología	Comité de Ética en Investigación y Docencia
50	Instituto de Ciencias Físicas	Comisión de Ética
51	Instituto de Ciencias Nucleares	Comité de Ética del Instituto de Ciencias Nucleares
52	Instituto de Ecología	Comité de Ética
53		Comité de Bioseguridad
54	Instituto de Energías Renovables	Comité de Ética del Instituto de Energías Renovables
55	Instituto de Física	Comité de Ética Académica y de Investigación
56	Instituto de Fisiología Celular	Comité de Bioseguridad
57		Comité de Integridad Académica y Científica
58		Comité de Ética en Investigación
59		Comité de Cuidado y Uso de Animales para la Enseñanza e Investigación (CICUAL)
60	Instituto de Geofísica	Comité de Ética
61	Instituto de Geografía	Comité de Ética
62	Instituto de Geología	Comité de Integridad Académica y Científica
63	Instituto de Ingeniería	Comité de Ética en Investigación y Docencia del IIUNAM (CÉTICAID-IIUNAM)
64	Instituto de Investigaciones Biomédicas	Comité de Ética en Investigaciones con Seres Humanos (CEISHUM)
65		Comité de Integridad Científica (CIC)
66		Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)
67	Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad	Comisión de Ética de Investigación y Docencia
68	Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas	Comité de Ética de la Investigación del IIMAS (CEI-IIMAS)

Número	Facultad/Centro/Instituto	Comité de Ética
69	Instituto de Investigaciones en Materiales	Comité de Integridad Académica y Científica
70	Instituto de Neurobiología	Comité de Ética en Investigación y Docencia
71	Instituto de Química	Comité de Ética de la Investigación
72		Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
73	Instituto de Radioastronomía y Astrofísica	Comité de Integridad Académica y Científica
74	Centro de Ciencias Genómicas	Comité de Ética del CCG
75	Centro de Ciencias Matemáticas	Comité de Ética en Investigación y Docencia
76	Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada	Comité de Ética en Investigación y Docencia
77	Centro de Geociencias	Comité de Ética en Investigación y Docencia
78	Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental	Comité de Ética en Investigación y Docencia
79	Centro de Nanociencias y Nanotecnología	Comité de Ética
80	Coordinación de Humanidades	Comité de Integridad Académica y Científica del Subsistema de Humanidades
81	Instituto de Investigaciones Antropológicas	Comité de Ética en Investigación y Docencia
82	Instituto de Investigaciones Bibliotecológicas y de la Información	Comité de Ética en Investigación y Docencia del IIBI
83	Instituto de Investigaciones Estéticas	Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Estéticas
84	Instituto de Investigaciones Filosóficas	Comité de Ética
85		Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Filosóficas
86	Instituto de Investigaciones Históricas	Comité de Ética
87	Instituto de Investigaciones Jurídicas	Comité de Ética del IIJ
88	Instituto de Investigaciones Sociales	Comité de Investigación y Docencia
89	Centro de Enseñanza para Extranjeros (CEPE)	Comité de Ética Centro de Enseñanza para Extranjeros
90	Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades	Comité de Ética CEIICH
91	Centro de Investigaciones Multidisciplinarias sobre Chiapas y la Frontera Sur (CIMSUR)	Comité de Ética en Investigación y Docencia
92	Centro de Investigaciones sobre América del Norte (CISAN)	Comisión de Ética del CISAN
93	Centro de Investigaciones sobre América Latina y del Caribe (CIALC)	Comité de Ética del Centro de Investigaciones sobre América Latina y El Caribe
94	Centro Peninsular en Humanidades y Ciencias Sociales (CEPHICS)	Comité de Ética en Investigación y Docencia
95	Programa de Estudios de la Diversidad Cultural y la Interculturalidad (PUIC)	Comité de Ética del Programa de Estudios de la Diversidad Cultural y la Interculturalidad
96	Programa Universitario de Estudios Sobre Asia y África (PUEAA)	Comité de Ética

de investigación respetuosa de la persona y su integridad. A ello habría que sumarle acciones que lleven a la profesionalización de estos comités por el bien de la ciencia y la humanidad. Las IES deben asumir el compromiso de cuidar que las investigaciones que se realicen en sus centros cumplan a cabalidad con las normativas nacionales e internacionales en todo momento; transparentando las actuaciones de sus investigadores y desarrollando una permanente vigilancia.

CONCLUSIONES

La regulación de la ética y la bioética en la investigación científica en México es indispensable para garantizar el avance en la materia, pero, sobre todo, para promover la integridad, seguridad y responsabilidad en el ámbito científico.

De la regulación de qué se hace y cómo se hace la investigación científica, particularmente en los casos en que los sujetos del estudio son personas, depende la protección de su bienestar y sus derechos. El Estado tiene la responsabilidad de velar por la salud y la integridad de las personas, por lo que debe vigilar y en su caso, castigar prácticas no éticas y promover la responsabilidad y transparencia en materia de investigación.

La CONBIOÉTICA es una institución fundamental en México para asesorar y coordinar esfuerzos para integrar la bioética en las políticas y programas públicos, así como vigilar que las prácticas científicas se desarrollen conforme a los principios éticos y bioéticos universales. La coadyuvancia de los Comités de Ética en Investigación debe asegurar un escenario propicio para generar investigación científica congruente con las normas éticas y legales, enfatizando aspectos como el consentimiento informado, la confidencialidad, el respeto a la dignidad humana, entre otros.

El papel de las instituciones públicas como el INSP, CONAHCyT, UNAM, entre otras, además de las IES públicas y

privadas es fundamental para el desarrollo de la investigación científica ética, apegada a la bioética, de calidad y que impulse el desarrollo del país.

Es de suma relevancia la profesionalización de los comités de ética y bioética de la investigación de cualquier institución, ya sea pública o privada pues ello redundará en la vigilancia y promoción de buenas prácticas en la investigación científica, siempre a favor del respeto de la dignidad humana.

La regulación de la ética y la bioética en la investigación científica en México es un gran avance para la protección de los derechos humanos. La eficacia de los comités de ética y bioética de la investigación científica es responsabilidad de todos, hagamos que suceda.

CONFLICTOS DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

Banco Mundial. (2024). *Datos: Gasto en investigación y desarrollo (% del PIB)*. Recuperado de https://datos.bancomundial.org/indicador/GB.XPD.RSDV.GD.ZS?end=2021&locations=MX-KR&start=1996&view=chart

Cancino, M. E., Gascón, A., Manrique de Lara, A., & Medina, M. J. (2019). *Comités de ética y bioética. Enseñanza Transversal en Bioética y Bioderecho*. IIJ-UNAM. Recuperado de https://archivos.juridicas.unam.mx/www/bjv/libros/13/6008/3.pdf

CONBIOÉTICA. (2015). *Comisiones Estatales de Bioética. Lineamientos Operacionales.* Comisión Nacional de Bioética, Secretaría de Salud, México. Recuperado de https://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/Lineamientos_Operacionales_paginado_con_forros.pdf

CONBIOÉTICA. (2024). *Listado de Registros Emitidos. Comités de Ética en Investigación*. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/948985/Registros_CEI.30092024.pdf

Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS). (2002). *Pautas éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos.* Ginebra: CIOMS.

Diario Oficial de la Federación (DOF). (1987). *Decreto por el que se crea el Instituto Nacional de Salud Pública como organismo descentralizado, con personalidad jurídica y patrimonio propios.* Recuperado de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4636332&fecha=26/01/1987#gsc.tab=0

Ferrer, M., & Pastor, L. (1999). ¿Vigencia del Código de Nüremberg después de cincuenta años? *Cuadernos de Bioética*, (37). Recuperado de https://aebioetica.org/revistas/1999/1/37/07-2-bioetica-37.pdf

Guerrero, V. (2004). ¿Quién es? Jorge Enrique Linares Salgado. *Revista ¿Cómo ves?*, (139). Recuperado de https://www.comoves.unam.mx/numeros/quienes/139

Gudiño-Cejudo, M. R., Magaña-Valladares, L., & Hernández Ávila, M. (2013). La Escuela de Salud Pública de México: su fundación y primera época, 1922-1945. *Salud Pública de México*, *55*(1), 81-91. Recuperado el 29 de mayo de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013000100012

INCyTU. (2018). *Inversión para ciencia, tecnología e innovación en México*. Nota-INCyTU núm. 11, febrero. Recuperado de https://www.foroconsultivo.org.mx/FCCyT/incytu/11.pdf

Ley de Nüremberg para la protección de la sangre alemana y del honor alemán de 15 de septiembre de 1935. Recuperado de https://www.yadvashem.org/yv/es/holocaust/about/pdf/nuremberg15.9.1935.pdf

Ley de Ciencia y Tecnología. (Abrogada). Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/lct/LCT_abro.pdf

Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGMHCTI.pdf

NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Recuperado de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013

NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012. Del expediente clínico. Recuperado de https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5272787

OHCHR.ORG. (2024). *El derecho a la salud: aspectos fundamentales e ideas erróneas comunes.* Recuperado de https://www.ohchr.org/es/health/right-health-key-aspects-and-common-misconceptions

OPS-CIOMS. (2017). *Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos* (4ª ed.). Ginebra. Recuperado de https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/12/CIOMS-EthicalGuideline_SP_INTERIOR-FINAL.pdf

Portal de Estadística Universitaria. (2024). *UNAM: La Universidad de la Nación.* Recuperado de https://www.estadistica.unam.mx/numeralia/

Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2021. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2021/PEF_2021_orig_30nov20.pdf

Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2022. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/pef_2022/PEF_2022_orig_29nov21.pdf

Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2023. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2023/PEF_2023_orig_28nov22.pdf

Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2024. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/PEF_2024.pdf

QS Topuniversities. (2025). *QS World University Rankings.* Recuperado de https://www.topuniversities.com/qs-world-university-rankings

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Recuperado de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf

Secretaría de Educación Pública. (2000). *Acuerdo por el que se reconocen diversas entidades paraestatales del Sistema SEP-CONACYT como Centros Públicos de Investigación*. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2058640&fecha=31/12/1969

Secretaría de Educación Pública. (2003). *Acuerdo por el que se resectorizan las Entidades Paraestatales que conforman el Sistema de Centros Públicos CONACYT, en el sector coordinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*. Recuperado de https://conahcyt.mx/wp-content/uploads/normatividad/normativa_interna/ACUERDO%20por%20

el%20que%20se%20resectorizan%20las%20Entidades%20Paraestatales.pdf

SCJN. (2008). *EXPEDIENTE CLÍNICO. ES DOCUMENTO PRIVADO SUJETO PARA SU VALORACIÓN A REQUISITOS ESTABLECIDOS EN REGULACIÓN ESPECIAL*. Tesis: I.4o.C.154 C. Registro digital: 168924. *Semanario Judicial de la Federación y su Gaceta,* XXVIII, Septiembre, 1266.

Salgado, G. A. (2022). *Libre desarrollo de la personalidad. Cuadernos de Jurisprudencia,* (16). Centro de Estudios Constitucionales de la Suprema Corte de Justicia de la Nación. Recuperado de https://www.sitios.scjn.gob.mx/cec/sites/default/files/publication/documents/2023-01/CUADERNO%20NUM%2016%20DH_LIBRE%20DESARROLLO_FINAL%20DIGITAL.pdf

Secretaría de Economía. (2024). *Sabes cómo te benefician las Normas Oficiales Mexicanas.* Recuperado de https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/sabes-como-te-benefician-las-normas-oficiales-mexicanas

Servicios de Investigación Científica y Desarrollo. (2024). *Inversión Extranjera Directa en Servicios de Investigación Científica y Desarrollo.* Recuperado de https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/industry/scientific-research-and-development-services

Stanford Libraries. (2024). *Digan sus nombres: No más nombres. Experimento de Sífilis de Tuskegee.* Recuperado de https://exhibits.stanford.edu/es/saytheirnames/feature/tuskegee-syphilis-experiment

UNAM. (2000). *Instituto de Investigaciones Jurídicas. Sexagésimo Aniversario.* UNAM, México. Recuperado de https://archivos.juridicas.unam.mx/www/bjv/libros/1/29/1.pdf

UNAM. (2024). *Institutos, Centros y Programas.* Recuperado de https://www.unam.mx/investigacion/institutos-centros-y-programas

UNAM. (2024). *Comités de Ética.* Recuperado de https://cuetica.unam.mx/comites-de-etica

UNESCO. (2026). *Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos.* Recuperado de https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000146180_spa

World Medical Association (WMA). (s.f.). *Declaración de Helsinki de la AMM: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.* Recuperado de https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Revisitando los contenidos curriculares y las actitudes bioéticas de los alumnos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Revisiting curricula contents and bioethical attitudes of undergraduate students at the Biological Sciences and Health Division of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

David Sebastián Contreras Islas*[1], Daniel Amador Aguilar[2], Norberto Abraham Tenorio Olivares[2], Carlos Kerbel Lifshitz[3], Marco Aurelio Pérez Hernández[4] y Enrique Mendieta Márquez[3]

[1] Candidato a Doctor en Educación por la Humboldt Universität zu Berlin.
[2] Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1 A Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.
[3] Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1 A Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.
[4] Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1 A Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09310, Ciudad de México.

RESUMEN

En México la bioética ha tenido un enfoque predominantemente médico, pero una perspectiva más amplia sobre esta temática ha cobrado relevancia en las últimas décadas. Bajo este enfoque, el objetivo del presente trabajo es analizar el contenido de bioética en los planes y programas de estudio de las licenciaturas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM), así como evaluar, a través de un cuestionario ad hoc, los componentes cognitivos, afectivos y conductuales de las actitudes de los alumnos de sus 6 licenciaturas en relación con problemáticas bioéticas, buscando correlaciones entre los contenidos curriculares y las actitudes de los alumnos, así como comparar estos resultados con los obtenidos en un estudio previo (Contreras Islas *et al*., 2016). Los resultados muestran un panorama general de actitudes favorables de los encuestados, con algunas diferencias entre los alumnos de las distintas licenciaturas, una situación en general, similar a la observada en el estudio previo. Al igual que en el estudio anterior, los resultados sugieren que los contenidos oficiales de los planes de estudio han tenido muy poco que ver con la adquisición de dichas actitudes por parte de los alumnos.

Palabras clave: Actitudes/Bioética/Educación Superior.

ABSTRACT

Bioethics has been discussed predominantly as a medical issue, although a broader perspective for its study has recently become important. Under this context, the purpose of this investigation was to evaluate the bioethical content of official undergraduate studies programs of the Biological and Health Sciences Division (DCBS) at the Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Campus (UAMI), as well as the cognitive, affective and active components of the attitudes of the undergraduate students of their six graduate programs, as well as to compare these results with those obtained in a previous study (Contreras Islas *et al*., 2016). Data show predominantly favorable attitudes towards a bioethical perspective, with some differences between students from different programs, a similar result to that previously obtained. Thus, these results suggest that the contents within the curricula seem to have little influence on the acquisition of these attitudes.

Keywords: Attitudes/Bioethics/Higher Education.

INTRODUCCIÓN

La ética del uso de seres vivos en la experimentación tuvo sus raíces en la década de los 30, cuando se elaboran normas al respecto en países europeos y en Estados Unidos. La visión original se vio modificada como resultado de la Segunda Guerra Mundial que puso en la palestra la necesidad de profundizar en la ética médica, buscando si no prohibir, al menos orientar las decisiones relacionadas con la justificación de los seres humanos como sujetos de experimentación.

Un concepto más amplio de bioética se encuentra en la obra de Potter. Para él, "la bioética se esfuerza por engendrar una sabiduría, un saber relacionado con la manera de utilizar el conocimiento para un bien social, sobre la base de un conocimiento realista de la naturaleza biológica del hombre y del mundo biológico" (Potter, 1971). Potter concibe una bioética global, que atraviesa todas las dimensiones de la vida humana. No se trata sólo de generar marcos éticos para el trato con animales y humanos en situaciones de investigación, sino integrar los conocimientos científicos – especialmente biológicos, ecológicos y clínicos – en los procesos de toma de decisión políticos, institucionales e individuales. Esta perspectiva amplia de bioética ha cobrado mayor relevancia en las últimas décadas (González Valenzuela y Linares Salgado, 2013; UNESCO, 2015).

*Autor para correspondencia: David Sebastian Contreras Islas
Correo-e: david.contreras@hu-berlin.de
Recibido: 31 de mayo de 2024
Aceptado: 1 de julio de 2024
Publicado: 22 de agosto de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2346

Siguiendo a Álvarez Díaz, "la bioética contemporánea, como disciplina consolidada, puede dividirse en una microbioética, una mesobioética y una macrobioética" (Álvarez Díaz, 2021). A cada uno de estos niveles competen temas y problemáticas particulares. El enfoque clínico y antropocéntrico de la ética médica, por ejemplo, sería característico de la *microbioética*, centrada en la toma de decisiones respecto al propio cuerpo. La *mesobioética*, en cambio, se enfoca en temas relacionados con "la toma de decisiones institucionales y estructurales" en cuestiones de salud humana. Finalmente, la *macrobioética* "abarca el grado propio de una bioética global, en la cual debe considerarse la ecoética o ética ecológica […], cuestiones de justicia global (con problemas tales como el turismo de salud, el turismo médico, etc.) y las relaciones entre bioética y biopolítica, así como la posibilidad de construir una bioética cívica mundial" (Álvarez Díaz, 2015).

En México la bioética comenzó a tener fuerza en los años 80 a partir de una serie de reformas a la Ley General de Salud en respuesta a las declaraciones y recomendaciones de organizaciones internacionales. Este proceso desemboca en la creación de la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) en el año 1992. Siguiendo con la tendencia internacional, la CONBIOÉTICA ha priorizado la atención de temas y preguntas al nivel de la microbioética. Paralelamente, han surgido grupos de investigación interesados en cuestiones meso y macrobioéticas, como el Seminario Permanente de Bioética y el Programa Universitario de Bioética de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI) existen planes de estudio que forman profesionales con actividades relacionadas con el estudio de los seres vivos y la salud humana. Desde una perspectiva bioética, la formación de estos profesionales debería orientarlos hacia el cumplimiento con las normas y legislaciones internacionales respectivas y, en general, brindarles las herramientas para tomar decisiones profesionales (y personales) consistentes con este enfoque. Esta perspectiva es consistente, además, con los planteamientos de interdisciplinariedad y responsabilidad social que se pueden encontrar en la legislación universitaria (Contreras Islas, 2018).

Adicionalmente, la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) aprobó los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, la Docencia y la Difusión, y constituyó la Comisión de Ética encargada de "emitir dictámenes sobre los problemas éticos planteados por los procedimientos de investigación, docencia y difusión en las ciencias de la vida y la salud" (UAM, 2010). En función de lo anteriormente mencionado, sería interesante indagar tanto los contenidos curriculares, como los conocimientos y actitudes de los alumnos en relación con la bioética.

Con este propósito, ente 2011 y 2013, nuestro grupo de trabajo analizó el contenido de bioética en los planes y programas de estudio de las 6 licenciaturas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS). En un segundo paso, se aplicaron encuestas para evaluar los componentes cognitivos, afectivos y conductuales de las actitudes de los alumnos de dichas licenciaturas y su relación con temas y problemáticas bioéticas. En un tercer paso, se buscaron correlaciones entre los contenidos curriculares y las actitudes de los alumnos, con miras a proponer modificaciones a los planes y programas de estudio. Los resultados de estos estudios (Contreras Islas *et al*., 2016; 2017a; 2017b) se difundieron entre la población universitaria con el objeto de impulsar cambios curriculares para fortalecer los contenidos de bioética e incidir positivamente en las actitudes de los alumnos.

Los planes y programas de estudio de las licenciaturas fueron modificados sustancialmente al año siguiente, por lo que consideramos relevante volver a realizar este estudio, considerando la posibilidad de que los cambios introducidos, así como las repercusiones de eventos traumáticos (la pandemia de COVID19), se vieran reflejados en los afectos y las actitudes de los alumnos hacia la problemática bioética.

Dada la importancia actual de la bioética para toda comunidad que desempeñe actividades docentes, de investigación o profesionales en el campo de las ciencias biológicas y de la salud, los involucrados en el presente estudio consideramos que el desarrollo de este tipo de proyectos resulta valioso y enriquecedor. Consideramos que los resultados obtenidos de un estudio semejante podrán servir, además, para revalorizar y, en su caso, mejorar las actitudes que la DCBS transmite a su comunidad y que deberían ser coherentes con los principios y conceptos plasmados, tan acertadamente, en sus documentos oficiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Concepto y contenido de bioética en los planes y programas de las licenciaturas de la DCBS, UAM-I

Para determinar la formación bioética que se pretende impartir a los alumnos de la DCBS, y en función de que nuevos planes y programas de estudio entraron en vigencia completa 4 años después de concluido el estudio previo, se analizaron los contenidos en los planes de estudio y los programas de las Unidades de Enseñanza-Aprendizaje (UEA) de las licenciaturas e ingenierías vigentes en 2021, utilizando las mismas 20 palabras clave, establecidas con base en el contenido de los Lineamientos de la Comisión de Ética de la DCBS (2010): autoconciencia, bioética, compromiso, conciencia, convivencia, cooperación, dignidad, equidad/igualdad, ética, justicia, legislación, ley, libertad, moral, norma, principio, regla, respeto, responsabilidad y tolerancia. Dichos términos pueden agruparse como propios del discurso de la bioética o la (bio)moral, si bien varios de ellos pueden considerarse igualmente válidos para referirse tanto a temáticas éticas en sentido amplio como a cuestiones propias de la moral, que son los mismos términos utilizados en el estudio previo (Contreras-Islas *et al*., 2016). Estas palabras clave se encuentran también en las Políticas de Docencia y en el Plan de Desarrollo Institucional (2011-2024) de la UAM.

De igual forma, se mantuvo la organización original de las seis licenciaturas de la DCBS (B = Biología, BE = Biología Experimental, H = Hidrobiología, IA = Ingeniería de los Alimentos, IBI = Ingeniería Bioquímica Industrial, y PA = Producción Animal) en tres grupos, de acuerdo con su enfoque particular plasmado en los objetivos generales de su currículo, agregando cinco palabras adicionales para el análisis de los planes de estudio y programas de cada uno de ellas, relacionadas con sus respectivas problemáticas y campos de trabajo (Tabla 1).

Tabla 1: Enfoques particulares y palabras adicionales para cada uno de los grupos de análisis definidos en sus planes de estudio. B = Biología, BE = Biología Experimental, H = Hidrobiología, IA = Ingeniería de los Alimentos, IBI = Ingeniería Bioquímica Industrial, y PA = Producción Animal.
Table 1. Particular approaches and additional words for each of the analysis groups defined in their curricula. B = Biology, BE = Experimental Biology, H = Hidrobiology, IA = Food Engineering, IBI = Industrial Biochemist Engineering, y PA = Animal Production.

Grupo	Licenciaturas	Enfoque particular	Palabras adicionales
A	B, BE	Comprensión del funcionamiento de los sistemas biológicos para la conservación de su integridad	Conservación Sustentabilidad / Sostenibilidad Cuidado de la comunidad de la vida Interés colectivo Derecho a la salud/ entorno natural
B	H, PA	Comprensión y aprovechamiento responsable de los sistemas biológicos para la producción de interés humano	Sustentabilidad / Sostenibilidad Responsabilidad social Valoración Cuidado de la comunidad de la vida Trato digno
C	IBI, IA	Aplicación de conocimientos para la innovación en tecnologías productivas de interés socioeconómico	Valoración Interés colectivo Prevención Principio de precaución Responsabilidad social

La búsqueda de palabras clave en los documentos se realizó utilizando la función de búsqueda avanzada de Acrobat Reader Pro DC, introduciendo una lista con las 25 palabras específicas para cada bloque, más otros términos relacionados semántica y etimológicamente con las palabras de búsqueda. Se determinaron las coincidencias con los términos buscados, además de analizar su contexto semántico para determinar si su uso aludía o no, efectivamente, al campo semántico de la ética.

Además, se cuantificaron aquellos casos donde una misma palabra apareciera de manera recurrente en distintas secciones del programa (p. ej. Objetivo General, Contenido Sintético, Bibliografía), por considerarlo un signo de mejor integración del concepto al mismo, en contraste con una mención meramente "formal" del concepto (p. ej. cuando éste aparece en la sección de Objetivo General, pero no surge nuevamente en ninguna parte del programa).

Diagnóstico de componentes bioéticos en los alumnos de las licenciaturas de la DCBS, UAM-I

Para determinar si las actitudes de los alumnos de las licenciaturas de la DCBS son favorables o desfavorables a la temática bioética, se consideraron elementos cognitivos, afectivos y conductuales, mismos que se reflejan finalmente en una predisposición a responder de cierta manera a los estímulos del entorno (Castro de Bustamante, 2003; Sánchez Fernández y Mesa Franco, 1998). Para la evaluación de elementos cognitivos, se consideró el conocimiento de los alumnos en torno al contenido de los Lineamientos de la Comisión de Ética, además de aspectos regulativos institucionales, nacionales e internacionales que en ellos se mencionan. En el caso de los componentes afectivos, se evaluó, ante todo, la preocupación y el sentido de responsabilidad, principalmente como miembro de una comunidad moral, que despiertan en él las cuestiones bioéticas, tanto dentro del campus universitario como en el plano de su vida cotidiana, así como su buena disposición a conocer y aceptar la importancia de las regulaciones bioéticas. Por último, el componente conductual buscará reflejar qué tan a menudo los alumnos incurren en acciones que sean coherentes con la responsabilidad hacia el entorno social y natural, el respeto a la vida en todas sus formas, la precaución y la prevención de riesgos.

En consecuencia, se considerará en este estudio como una actitud bioética favorable, aquélla que refleje más afinidad por conocimientos, afectividades y conductas coherentes con los principios planteados, directa o indirectamente, por la Comisión de Ética de la DCBS en sus documentos oficiales (Reglamento interno y Lineamientos), perspectiva semejante a la utilizada en el estudio anterior (Contreras Islas *et al*., 2017a; 2017b).

Composición de la muestra y método de muestreo

Considerando los datos de alumnos inscritos en cada licenciatura durante los trimestres 23-P y 23-O, proporcionados por la Coordinación de Sistemas Escolares, y siguiendo las consideraciones de Babbie (2000), Baena (1996), Rojas Tejada *et al*. (1998) y Sulbarán (2009), se determinó un tamaño de muestra que abarcara entre el 5 % y el 10 % de la población total. Adicionalmente, la muestra debería reflejar de forma aproximada los porcentajes que el número de alumnos de cada licenciatura aportan al total de alumnos de licenciatura en la DCBS. Finalmente, por consideraciones operativas, el cuestionario fue aplicado a un total de 207 alumnos de las 6 licenciaturas de la DCBS, de manera presencial en la mayoría de los casos, o bien en línea utilizando un formato digital en la plataforma de Google Forms, habiendo recabado previamente el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio.

El número total de alumnos que contestaron el cuestionario se muestra en la Tabla 2. Cabe señalar que la matrícula

Tabla 2. Número de encuestas aplicadas a los alumnos de las licenciaturas de la DCBS y porcentaje con respecto al total.
Table 2. Number of surveys applied to DCBS undergraduate students and percentage with respect to the total.

Licenciatura	Encuestas aplicadas (% del total)
Biología (B)	51 (24.64).
Biología Experimental (BE)	50 (24.15)
Hidrobiología (H)	20 (9.66)
Ingeniería Bioquímica Industrial (IBI)	38 (18.36)
Ingeniería de los Alimentos (IA)	34 (16.43)
Producción Animal (PA)	14 (6.76)
Total	207 (100)

de las Ingenierías representa cerca del 50 % del total de los alumnos de la DCBS, por lo que existe una subrepresentación de la muestra originalmente planteada para el estudio, si bien los resultados obtenidos no parecen mostrar sesgo alguno debido a esta circunstancia.

La distribución de los alumnos con respecto a su trayectoria escolar fue también homogénea., ya que la muestra incluyó alumnos inscritos en los primeros trimestres (menos de 125 créditos cursados), intermedios (entre 126 y 375 créditos) y los que ya se encontraban cursando el último año de sus licenciaturas (más de 376 créditos).

Elaboración y validación del instrumento

Se elaboró el cuestionario compuesto por 47 preguntas y dividido en cuatro secciones empleado en el estudio anterior (Contreras Islas *et al*., 2017a). En la primera sección, se preguntaba al alumno si conocía el concepto de bioética y, en caso de recibir una respuesta afirmativa, se le pedía que escribiera brevemente lo que entendía por dicho concepto (pregunta 2), y que realizara una asociación de palabras sobre el mismo (pregunta 3) y que pasara a la siguiente sección.

La segunda sección, compuesta por diez preguntas, era relativa a la información en materia de bioética recibida por el alumno a lo largo de su formación académica, dentro y fuera de la UAM-I. Se pedía al alumno que contestara, primero, si había recibido información en materia de bioética durante su formación académica y, en caso de haberla recibido, se le pedía especificar en qué parte y por qué medios

La tercera sección estaba compuesta por 30 ítems de una escala tipo Likert para la medición de actitudes, elaborada con base en el manual de Méndez Hinojosa *et al*. (2006) y las apreciaciones de Sulbarán (2009) para la medición de actitudes. Los 10 primeros ítems fueron destinados a evaluar componentes cognitivos, los siguientes 10, componentes afectivos y los últimos 10, componentes conductuales de la actitud bioética, con base en los elementos señalados al principio de este inciso.

Las escalas tipo Likert se construyen generando un elevado número de afirmaciones que califican al objeto de una actitud. Para ello, se generó una matriz de respuestas para cada ítem con una escala continua de valores del 1 al 5, donde 1 es totalmente en desacuerdo y 5 totalmente de acuerdo. Un grupo de ítems puede representar una variable o la dimensión de una variable, que recibe el valor de la sumatoria de los valores asignados a cada ítem.

La última sección se componía de 4 preguntas sobre datos académicos del encuestado, básicamente: licenciatura, trimestre de ubicación, créditos acumulados y áreas de interés. Se trataba básicamente de preguntas de opción múltiple y algunas respuestas abiertas, que se manejaron siempre como valores de variables nominales durante el análisis.

La principal característica del método de Likert es que prescinde del método de validación por jueces, optando, en cambio, por la realización de una prueba piloto del instrumento. En este sentido, se realizó una prueba piloto con una versión del cuestionario que incluía una amplia sección de comentarios, en la que la persona encuestada pudiera opinar respecto a la estructura, claridad y pertinencia de los ítems. Participaron 40 alumnos y 5 profesores de la DCBS. Se eligieron profesores que tuvieran experiencia trabajando con cuestionarios. Los resultados de la prueba piloto se incorporaron a la versión final del instrumento.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de los 207 cuestionarios se procesaron y analizaron empleando el programa IBM SPSS V. 21. Los ítems de las secciones uno, dos y cuatro se manejaron como variables nominales, mientras que los ítems de la escala de Likert se manejaron como variables ordinales.

Para el análisis de las escalas de Likert, se obtuvieron los promedios de los diferentes ítems asignando valores numéricos a las respuestas y se consideraron éstas como "muy malas" (1), "malas" (2), "neutras" (3), "buenas" (4) o "muy buenas" (5). Para la calificación de las respuestas, éstas se consideraron como favorables solamente cuando sus promedios eran mayores de 3. Los resultados para los componentes cognoscitivos, afectivos y conductuales se compararon utilizando los promedios de las preguntas consideradas como significativas para cada uno de estos grupos, y se compararon los resultados obtenidos entre los alumnos de las diversas licenciaturas.

La escala tipo Likert para la medición de actitudes (sección tres del cuestionario) se validó empleando la prueba de T de Student, realizando la prueba por duplicado para las respuestas de 50 y 120 cuestionarios elegidos al azar, respectivamente. De acuerdo con lo estipulado por Méndez Hinojosa *et al*. (2006), se consideraron válidos únicamente aquellos ítems que tuvieron un valor de T mayor al reportado en las tablas estándar en al menos una de las pruebas.

La escala compuesta únicamente por los ítems validados mediante la prueba de T de Student fue sometida a la prueba de Alfa de Cronbach obteniendo un valor de 0.708, mismo que refleja una adecuada correlación entre los componentes de la escala, corroborando su validez (Ander-Egg, 1995; Babbie, 2000; Rojas Tejada *et al*., 1998). Únicamente estos ítems fueron considerados para el resto del análisis de esta sección.

La tabla 3 indica los ítems de cada sección del cuestionario que obtuvieron una Chi Cuadrada menor a 0.05 al correlacionarse con la variable "Licenciatura que cursa", en la que se reunieron los datos de las licenciaturas a las que estaban inscritos los encuestados. Por su relevancia estadística, el análisis y la discusión de los resultados se enfocan exclusivamente en estos elementos.

Se buscaron correlaciones entre los ítems de la sección cuatro del cuestionario (referentes a datos académicos del encuestado) y los ítems de las primeras tres secciones empleando la prueba de Chi Cuadrada. Para aquellos casos en los que el valor de Chi Cuadrada fue menor a 0.05, los datos fueron transformados a un formato de Microsoft Excel 2010 y procesados para obtener representaciones gráficas que permitieran visualizarlos de forma más clara.

Tabla 3. Ítems de cada sección que obtuvieron una correlación entre las respuestas obtenidas y la licenciatura a la que pertenece el encuestado (variable "Licenciatura que cursa") en más del 95% de los casos, según la prueba de Chi Cuadrada. En la sección III, se aplicó la prueba a la escala completa, pero sólo se consideraron para el análisis aquellos ítems que, además, hubieran sido validados con las pruebas de T de Student y Alfa de Cronbach.
Table 3. Items in each section that obtained a correlation between the responses obtained and the degree to which the respondent belongs (variable "study program") in more than 95% of the cases, according to the Chi-squared test. In section III, the test was applied to the entire scale, but only those items that had been validated with Student's t-tests and Cronbach's alpha were considered for the analysis.

Sección	No. de Ítem	Pregunta o enunciado	Chi Cuadrada
I	1	¿Has escuchado, leído o utilizado el término "bioética?	<0.001
II	1	¿Has recibido información sobre bioética en tu formación académica?	0.003
	4	El concepto de bioética se refiere al estudio de los problemas éticos, sociales, humanísticos y legales de la biotecnología, la biología, la medicina, la genética y el manejo de organismos vivos.	0.047
	5	La bioética se fundamenta en principios y valores que son más religiosos que científicos.	0.05
	12	Las normas bioéticas complican y entorpecen la investigación científica.	0.003
	13	La implementación de normas bioéticas implica gastos innecesarios.	0.046
III	14	Me molesta cuando alguien no toma en cuenta las consecuencias de sus acciones sobre el medio ambiente.	0.043
	20	Me siento satisfecho cuando influyo en que compañeros, familiares o amigos actúen de manera más responsable hacia el entorno social y natural.	0.022
	22	Apoyo la elaboración de protocolos de investigación que minimicen el uso de seres vivos como modelos experimentales.	<0.001
	25	Siempre externo mi opinión cuando me parece que algún miembro de mi comunidad actúa de forma no ética.	0.042
	26	Trato respetuosamente a los seres vivos con los que convivo dentro del campus universitario.	0.032

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concepto y contenido de bioética en los planes y programas de las UEA.

El análisis muestra que las 20 palabras clave planteadas para todos los planes y programas de estudio tienen poca presencia en los contenidos y objetivos de todas las licenciaturas, y que la mayoría de las coincidencias se relacionaron más bien con las cinco palabras adicionales propuestas para cada licenciatura e ingeniería (Tabla 4). Estas diferencias son particularmente evidentes para el caso de BE, IA y PA, donde el porcentaje de UEA con coincidencias para palabras clave específicas llega a duplicar el que se presenta para las palabras clave comunes. Cabe señalar también que PA es la única licenciatura que cuenta una UEA optativa con el nombre especifico de Bioética en su currículo, y que su contenido sintético se corresponde directamente con la temática.

En cuanto al número total de UEA que presentan coincidencias (Figura 1), la mayor proporción se encuentra para PA y H, mientras que se observa el menor número de coincidencias para ambas Ingenierías (IA e IBI). En este último caso, la mayoría de las coincidencias se concentran en sus UEA optativas; de tales coincidencias, los tópicos con mayor frecuencia fueron los relacionados con Normas y Responsabilidad Social, y Principio e Interés Colectivo, formando un 75.43 % de todas las coincidencias encontradas.

En el estudio previo realizado en 2013, Contreras Islas *et al*. (2016) encontraron una presencia claramente diferente de la temática bioética para las distintas licenciaturas, siendo posible ubicar a H y PA en un grupo con alta inclusión (alrededor de la mitad de sus UEA contiene alguna palabra clave), a B e IA en un grupo con una inclusión media (con presencia de palabras clave en alrededor de la tercera parte de sus UEA) y a IBI y BE en un grupo con una inclusión baja (menos de esta proporción).

Cuando se contrastan los datos con los planteamientos bioéticos contemplados explícitamente en los planes y programas de estudio de las licenciaturas, es interesante que el menor número de UEA con recurrencias (considerado el criterio más directo de compromiso con los conceptos en el marco bioético) se presenta para los alumnos de BE y de IBI (Figura 1). Los primeros aparentemente obtendrían sus nociones bioéticas a través de la UEA del mismo nombre, la cual es considerada como optativa en su plan de estudios, pero no es claro cuál sería la fuente de información para el caso de IBI. Este fenómeno no se observa para B ni para H, que presentan una recurrencia de entre el 20 y el 25 % de sus UEA. En relación con el estudio anterior, la inclusión recurrente sigue

Tabla 4. Porcentajes de UEA que incluyen las 20 palabras clave comunes a todas las licenciaturas y las 5 específicas en sus objetivos generales y específicos, de acuerdo a los criterios señalados en la sección de Materiales y Métodos.
Table 4. Percentages of UEA that include the 20 keywords common to all degree programs and the 5 specific keywords in their general and specific objectives, according to the criteria indicated in the Materials and Methods section.

Licenciatura	Palabras clave comunes (n=20)	Palabras clave específicas (n=5)
Biología (B)	48.75	51.25
Biología Experimental (BE)	28.57	71.43
Hidrobiología (H)	46.01	53.99
Ingeniería de los Alimentos (IA)	34.72	65.28
Ingeniería Bioquímica Industrial (IBI)	47.36	52.64
Producción Animal (PA)	30.09	69.91
Promedio	39.25	60.75

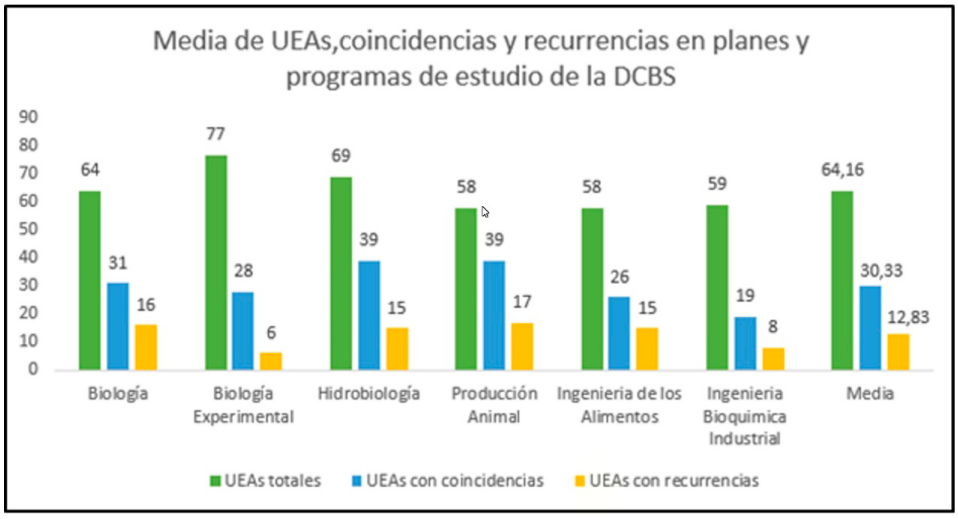


Figura 1. Total de UEAs, coincidencias y recurrencias en los programas de estudio de las licenciaturas de la DCBS. Se muestra el número total de UEA para cada currículo, así como el de UEA que presentan coincidencias (presencia de la palabra clave al menos en una ocasión) o recurrencia (presencia de la palabra clave en varios elementos del programa).
Figure 1. Total UEA, coincidences and recurrences in the curricula of the DCBS degree programs. The total number of UEA for each curriculum is shown, as well as the number of UEA showing coincidences (presence of the keyword at least once) or recurrence (presence of the keyword in several elements of the program).

aproximadamente el mismo patrón, aunque en porcentajes considerablemente más bajos, menores del 20 % del total de UEA, con excepción de PA que alcanza alrededor del 35 %.

Los resultados obtenidos en el estudio anterior sugieren que, en aquel momento, la temática bioética no se había incluido como un elemento formativo sólido dentro de los planes y programas de estudio de las licenciaturas de la DCBS, además de haberse incorporado de forma desigual a licenciaturas que supuestamente deberían ser cercanas por los perfiles de egreso de sus alumnos, como es el caso de B y BE, o de IBI e IA.

Si bien en términos generales todos los planes de estudio actuales han incrementado la presencia de conceptos relacionados con la bioética, los porcentajes de recurrencia que se consideran un mejor indicador de la relevancia de la inclusión temática en los programas a nivel de objetivos y contenidos sintéticos, siguen siendo de alrededor del 12 % en promedio, e incluso menores del 10 % en el caso de BE (Figura 2).

Diagnóstico de actitudes bioéticas de los alumnos

Secciones I/II: Concepto de bioética, formación académica y conocimientos sobre el tema

En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de alumnos que respondieron de forma positiva a las preguntas: ¿Has escuchado, leído o utilizado el término bioética?, ¿Has recibido información sobre bioética en tu formación académica? y ¿Has recibido información sobre bioética en la UAM?

Alrededor del 75 % de los alumnos tuvieron una respuesta afirmativa cuando se les preguntó si habían escuchado, leído o utilizado el termino de bioética, si bien había alumnos que no conocían el término, e incluso pedían una introducción sobre lo que se preguntaba en el cuestionario.

Tabla 5. Porcentajes de respuestas afirmativas a los ítems de las secciones I y II del cuestionario que obtuvieron una correlación entre las respuestas obtenidas y la licenciatura a la que pertenece el encuestado (variable "Licenciatura que cursa") en más del 95 % de los casos, según la prueba de Chi Cuadrada.
Table 5. Percentage of affirmative answers to the items in sections I and II of the questionnaire that obtained a correlation between the answers obtained and the degree to which the respondent belongs (variable " study program") in more than 95 % of the cases, according to the Chi-Square test.

Item	Licenciaturas						Promedio
	B	BE	H	IA	IBI	PA	
¿Has escuchado, leído o utilizado el término bioética	72.55	90.00	70.00	58.82	72.97	85.71	75.01
¿Has recibido información sobre bioética en tu formación académica	41.18	70.00	40.00	35.29	37.84	78.57	50.48
¿Has recibido información sobre bioética en la UAM?	27.45	64.00	30.00	26.47	35.14	78.57	43.61

Aproximadamente la mitad de los alumnos señalaron no haber recibido información sobre bioética. Debe resaltarse la percepción de los alumnos acerca de no haber recibido información sobre el tema en la UAM, pero algunos ya traían conocimientos desde la secundaria, aunque en un porcentaje muy pequeño.

Se pudo observar que las principales fuentes de información de los alumnos, previo a su ingreso a la UAM, son las páginas de internet, así como algunas experiencias propias a través de talleres y prácticas ilustrativas en el ámbito de la educación ambiental. Un número pequeño señaló que había recibido información acerca del tema en la secundaria

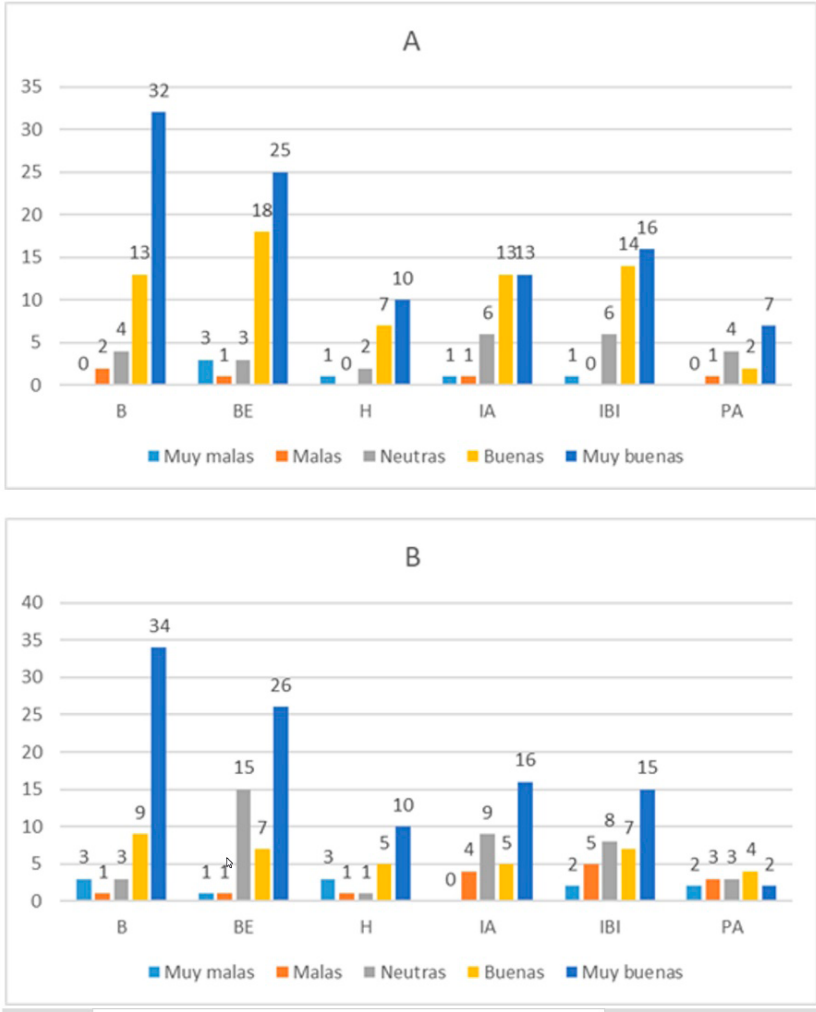


Figura 2: Respuestas recibidas para las preguntas "*El concepto de bioética se refiere al estudio de los problemas éticos, sociales, humanísticos y legales de la biotecnología, la biología, la medicina, la genética y el manejo de organismos vivos*" (A) y "*La bioética se fundamenta en principios y valores que son más religiosos que científicos*" (B). Para la segunda, las respuestas se categorizaron en orden invertido para la asignación de valores numéricos, considerando como "muy buenas" a las que correspondían al enunciado "totalmente en desacuerdo".

Figure 2. Responses received for the questions "*The concept of bioethics refers to the study of the ethical, social, humanistic and legal problems of biotechnology, biology, medicine, genetics and the handling of living organisms*" (A) and "*Bioethics is based on principles and values that are more religious than scientific*" (B). For the second, the responses were categorized in reverse order for the assignment of numerical values, considering as "very good" those that corresponded to the statement "totally disagree".

y en la preparatoria o directamente a través de pláticas con profesores, sobre todo en las materias relacionadas con Ciencias Naturales, lo que parece indicar la importancia de una primera aproximación al tema desde un ámbito no formal.

Para el caso de los que sí habían tenido información previa, se observó que las principales fuentes de información de los alumnos son la UEA de Bioética y otros cursos optativos en la UAM, que parecen ser más atendidos por los alumnos de BE y PA. Llama la atención que aproximadamente una cuarta parte de los encuestados no contestó esta pregunta, particularmente los alumnos de B, por lo que parece posible la existencia de un sesgo en las respuestas a este ítem.

Es importante señalar que, a pesar de esta falta de aproximación a los temas bioéticos, la totalidad de los encuestados consideró necesaria la existencia de un abordaje formal de éstos en algún momento de su formación académica.

Los resultados del estudio previo (Contreras Islas *et al*., 2016) mostraron que solamente un 54 % de los encuestados tenía conocimientos previos sobre bioética, y de éstos prácticamente ninguno había obtenido la información directamente en la UAM, porcentaje que, como se mencionó anteriormente, aumentó al 75 % en estudio. Estos datos parecen indicar que la presencia formal de conceptos relacionados con la temática se incrementó con el cambio de planes y programas de estudio (a nivel de coincidencias), si bien habría

que determinar si la falta de recurrencia de éstos permitiría a los alumnos fijar de manera significativa la importancia del enfoque bioético en su formación. Un punto importante a resaltar es que, a pesar de la falta de información consistente sobre el tema, nuevamente todos los alumnos encuestados, manifestó que la bioética debería formar parte de su formación.

Andino (2015) discute acerca del lugar de la ética en el marco de los saberes técnicos y señala, junto con Hortal (2010), que "ser competentes técnicamente es una condición necesaria, aunque no suficiente, para ser moralmente responsables en el ejercicio profesional". En este sentido, valdría la pena cuestionarse si el enfoque formal del estudio de la bioética (a través de programas específicamente diseñados para ello) o el abordaje de la temática a través del planteamiento de dilemas (Hirsch Adler, 2020), un enfoque más empírico, serían la mejor forma de generar actitudes favorables en los alumnos.

Otro elemento que llama la atención es que un 74 % de los encuestados desconoce la existencia de una Comisión de Ética en la DCBS, una proporción, si bien menor al 93 % detectado hace 10 años, habla de la falta de impacto de la estructura institucional diseñada para guiar el enfoque bioético en la División, particularmente si se considera que dicha Comisión debería encargarse de "suministrar información y organizar debates, talleres o encuentros entre docentes, estudiantes e investigadores…de suerte que la observancia de las normas se conviertan en un hábito…auspiciando una visión ética sobre el desarrollo científico" (UAM, 2010). Sin embargo, parecería que algún efecto, por pequeño que sea, se está logrando por vías no necesariamente institucionales.

Si la presencia de temáticas bioéticas en los programas de las UEA de los planes de estudio de cada licenciatura fuera por sí sola una garantía de que los alumnos recibirán dicha información, podríamos esperar una cierta proporción entre el porcentaje de UEA con contenido bioético dentro del plan de cada licenciatura y el porcentaje de alumnos de cada licenciatura que han recibido información del tema en la UAM. Sin embargo, como se verá en el inciso siguiente, dicha correlación no existe, o al menos no es lo suficientemente clara, lo que sugiere que la relación entre contenidos curriculares y actitudes es compleja, y no lineal.

Sección III: Análisis de la escala de medición de actitudes

En esta sección del cuestionario únicamente se analizaron los ítems que cumplieron los criterios señalados para establecer como válida su correlación con la variable "licenciaturas a las que estaban inscritos los encuestados". Cabe señalar que, en algunos casos que se señalan de manera específica, los valores de las escalas se invirtieron para calcular, a través de la suma de los 3 enfoques, las actitudes consideradas como favorables.

Componentes cognitivos

Con respecto al ítem 4 (*El concepto de bioética se refiere al estudio de los problemas éticos, sociales, humanísticos y legales de la biotecnología, la biología, la medicina, la genética y el manejo de organismos vivos*), el porcentaje de respuestas favorables fue mayor del 50 % para todas las licenciaturas, siendo particularmente elevado en el caso de B, con un 60 % de respuestas "muy buenas" (Figura 2, Panel A).

De manera sorprendente, las respuestas a la otra pregunta analizada (*La bioética se fundamenta en principios y valores que son más religiosos que científicos*) fue muy diversa, desde solamente un 40 % de respuestas favorables para PA hasta más del 80 % para el caso de B. Llama también la atención que, para todas las licenciaturas con excepción de B, el porcentaje de respuestas "neutras" fue de alrededor del 25 % (Figura 2, Panel B).

Para la determinación del porcentaje de respuestas que reflejaron conocimientos favorables y desfavorables en esta categoría, se promediaron los resultados de ambas preguntas. El porcentaje de respuestas que indican conocimientos favorables se mantuvo alrededor del 50 % para toda la muestra, si bien existen variaciones de casi un 10 % entre la

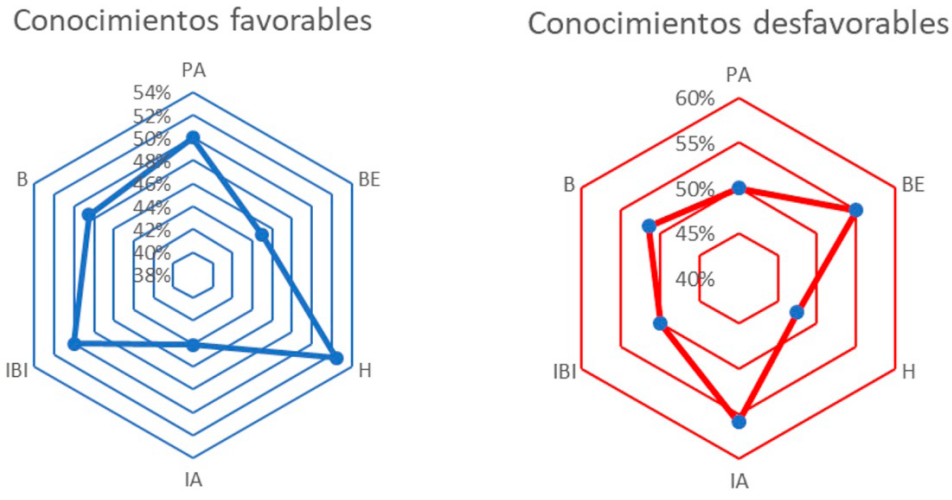


Figura 3. Porcentaje de alumnos de las diferentes licenciaturas con conocimientos considerados como favorables o desfavorables.
Figure 3. Percentage of students from the different degree programs with knowledge considered favorable or unfavorable.

licenciatura con mayor número de respuestas favorables (H, con 53 % de respuestas favorables) y la de menor número (IA, con sólo 44 % de respuestas favorables) (Figura 3).

Cuando se comparan las calificaciones totales para esta sección, aparecen más claramente diferencias entre las licenciaturas, particularmente cuando se separan ambas preguntas en el análisis. Es interesante notar que la posición de los alumnos de la mayoría de las licenciaturas al respecto de si la bioética se apoya en principios religiosos más que científicos, es valorada de una manera más neutral, con respecto a la otra pregunta de este inciso. Esta diferencia es más notoria para PA e IBI, aunque no parece ser significativa para B y BE.

Componentes afectivos

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, en este rubro solamente se consideraron las preguntas 12, 13, 14 y 20, para las que se incluyen los resultados correspondientes. Cabe señalar que uno de los alumnos de la licenciatura de IBI no contestó ningún de los ítems de esta sección del cuestionario.

Para la pregunta 12 (*Las normas bioéticas complican y entorpecen la investigación científica*) y 13 (*La implementación de normas bioéticas implica gastos innecesarios*), la categorización de respuestas se consideró de forma invertida, ya que las preguntas se plantearon en forma negativa, mientras que para las preguntas 14 (*Me molesta cuando alguien no toma en cuenta las consecuencias de sus acciones sobre el medio ambiente*) y 20 (*Me siento satisfecho cuando influyo en que compañeros, familiares y amigos actúen de manera más responsable hacia el entorno social y natural*), los valores se consideraron en el orden normal.

Con respecto al ítem 12, las respuestas favorables se presentan entre el 50 y el 60 % para todas las licenciaturas, si bien debe señalarse que entre el 20 y el 30 % de todos los alumnos optaron por la valoración "neutra" del enunciado, y que hasta un 25 % de los alumnos de IBI estuvieron de acuerdo con la noción de que las normas bioéticas no favorecen el desarrollo de las investigaciones científicas, comparado con el 12 % presente en alumnos de BE (Figura 4, Panel A).

En lo que corresponde al ítem 13, B, BE e IBI presentan alrededor del 70 % de valoraciones favorables, siendo este último caso particularmente interesante, ya que no muestra el mismo comportamiento que se observa para la pregunta anterior. Otro elemento que debe resaltarse es el hecho de que solamente el 50 % de los alumnos de PA indicaron respuestas favorables a este ítem (Figura 4, Panel B).

Las otras 2 preguntas analizadas en este inciso presentan en general una valoración más favorable para todas las licenciaturas, con más del 80 %, si bien debe notarse el caso de PA, con alrededor del 50 % de opiniones positivas y un número significativo de valoraciones neutras (Figura 4, Paneles C y D).

El porcentaje de respuestas que indican afectividades favorables se mantuvo alrededor del 50 % para la mayoría de las licenciaturas, si bien PA y BE presentan una mayor proporción de respuestas desfavorables (59 y 54 %, respectivamente) y la de menor número (IA, con sólo 44 % de respuestas favorables) (Figura 5).

Cuando se comparan las calificaciones totales para esta sección, aparece más claramente la diferencia existente entre las evaluaciones de todas las licenciaturas con respecto a PA, que presenta el puntaje más bajo para casi todos los ítems. particularmente cuando se separan ambas preguntas en el análisis. Es interesante notar que cuando los planteamientos se expresan en forma negativa (Ítems 12 y 13), la posición

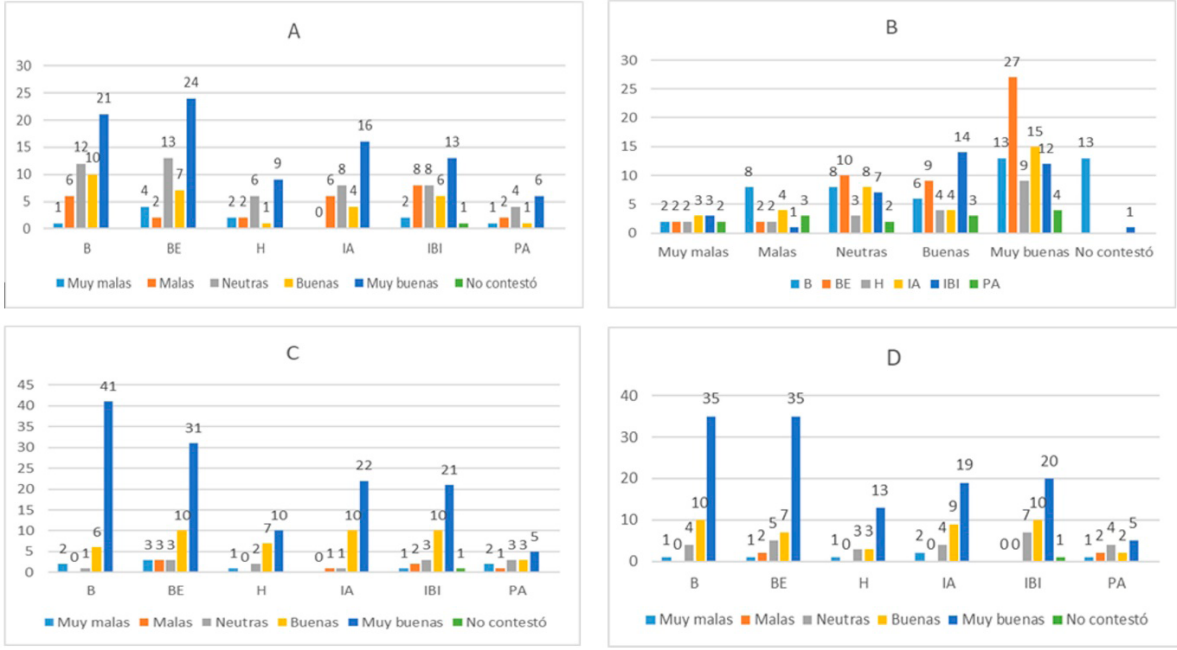


Figura 4: Respuestas recibidas para los ítems 12 (A), 13 (B), 14 (C) y 20 (D). Para los primeros dos, las respuestas se categorizaron en orden invertido para la asignación de valores numéricos, considerando como "muy buenas" a las que correspondían al enunciado "totalmente en desacuerdo".

Figure 4. Responses received for items 12 (A), 13 (B), 14 (C) and 20 (D). For the first two items, the responses were categorized in reverse order for the assignment of numerical values, considering as "very good" those that corresponded to the statement "totally disagree".

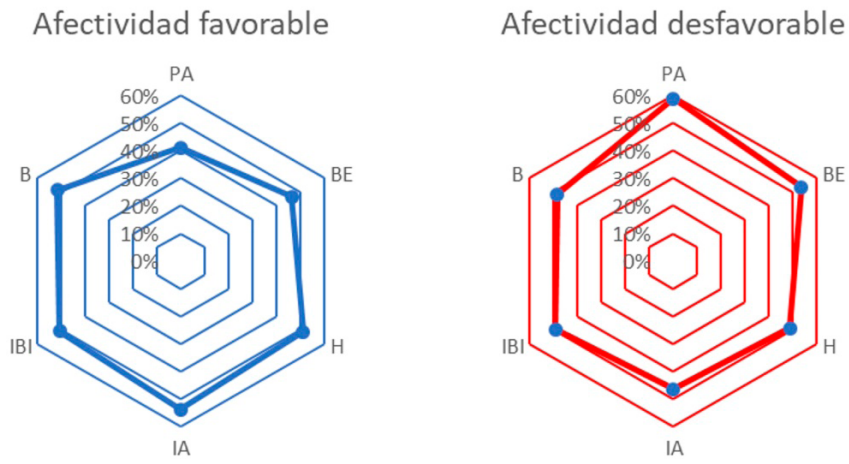


Figura 5. Porcentaje de alumnos de las diferentes licenciaturas con afectividades consideradas como favorables o desfavorables.
Figure 5. Percentage of students from the different degree programs with affectivities considered favorable or unfavorable.

de los alumnos de todas las licenciaturas es valorada de una manera más neutral, si bien esto no se aprecia para PA.

Componentes conductuales

Para este rubro solamente se consideraron los ítems 22, 25 y 26, para las que se incluyen los resultados correspondientes. Cabe señalar que los enunciados de esta sección pretenden analizar la predisposición de los encuestados para realizar o no ciertas conductas que se valorarían como "correctas" desde una perspectiva bioética, más que determinar si las llevarían realmente a cabo o no.

Con respecto a la pregunta 22 (*Apoyo la elaboración de protocolos de investigación que minimicen el uso de seres vivos como modelos experimentales*), las respuestas favorables se presentan entre el 50 y el 68 % para todas las licenciaturas, si bien debe señalarse que entre el 20 y el 30 % de los alumnos de las licenciaturas en B y BE optaron por la valoración "neutra" del enunciado, una proporción significativamente diferente de la presente para los alumnos de las demás licenciaturas (Figura 6, Panel A). Este comportamiento es interesante, ya que el perfil curricular de los egresados de BE se orienta específicamente hacia la experimentación utilizando seres vivos, algo que no corresponde al de los alumnos de B.

En lo que corresponde al ítem 25 (*Siempre externo mi opinión cuando me parece que algún miembro de mi comunidad actúa de forma no ética*), llama la atención el caso de la licenciatura en PA, cuyos alumnos eligieron la opción "neutral" en una proporción del 60 %. Para el resto de las licenciaturas, la proporción de valoraciones favorables se situó alrededor del 50 % (Figura 6, Panel B).

Finalmente, el trato respetuoso a los animales planteado en el ítem 26 (Figura 6, Panel C), es claramente un aspecto incorporado en el imaginario de todos los estudiantes de la DCBS.

En consecuencia, esto parece indicar que los alumnos no participarían en proyectos de investigación en los cuales no se tengan las normas bioéticas necesarias para el uso de animales y su relación con el medio ambiente, aunque es interesante detectar que algunos alumnos sí consideran la posibilidad de su participación en investigaciones que no cumplan con las normas bioéticas.

El porcentaje de respuestas que indican afectividades favorables se mantuvo alrededor del 50 % para la mayoría de las licenciaturas, si bien PA presenta una proporción equivalentes para ambos tipos de conductas, y por otra parte IA sólo muestra alrededor de un 25 % de conductas no favorables.

Cuando se comparan las calificaciones totales para esta sección, aparece más claramente la diferencia existente entre las evaluaciones de todas las licenciaturas con respecto a PA, que presenta el puntaje más bajo para dos de los tres ítems, particularmente cuando se separan ambas preguntas en el análisis. Es interesante resaltar la baja puntuación para la pregunta relacionada con la actitud proactiva de todos los alumnos ante la posibilidad de manifestar su opinión cuando las acciones de los demás no corresponden a su posición personal.

Perfil actitudinal

La combinación de los componentes cognitivos, afectivos y conductuales expuestos hasta el momento permite hacer referencia a la actitud bioética de los alumnos de las diferentes licenciaturas. La figura 8 presenta los promedios de los puntajes obtenidos para los componentes cognitivos, afectivos y conductuales (Panel C), así como la calificación promedio para los alumnos de cada licenciatura.

De manera general, puede decirse que la mayoría de los encuestados presenta actitudes favorables a la perspectiva bioética, lo que se ve reflejado en un puntaje promedio de alrededor de 4. Como se esperaría, los alumnos de B tuvieron el puntaje más elevado (4.28), pero es interesante que para H el promedio es de 3.9 y que PA reflejara el menor nivel de actitudes favorables con un puntaje de 3.64.

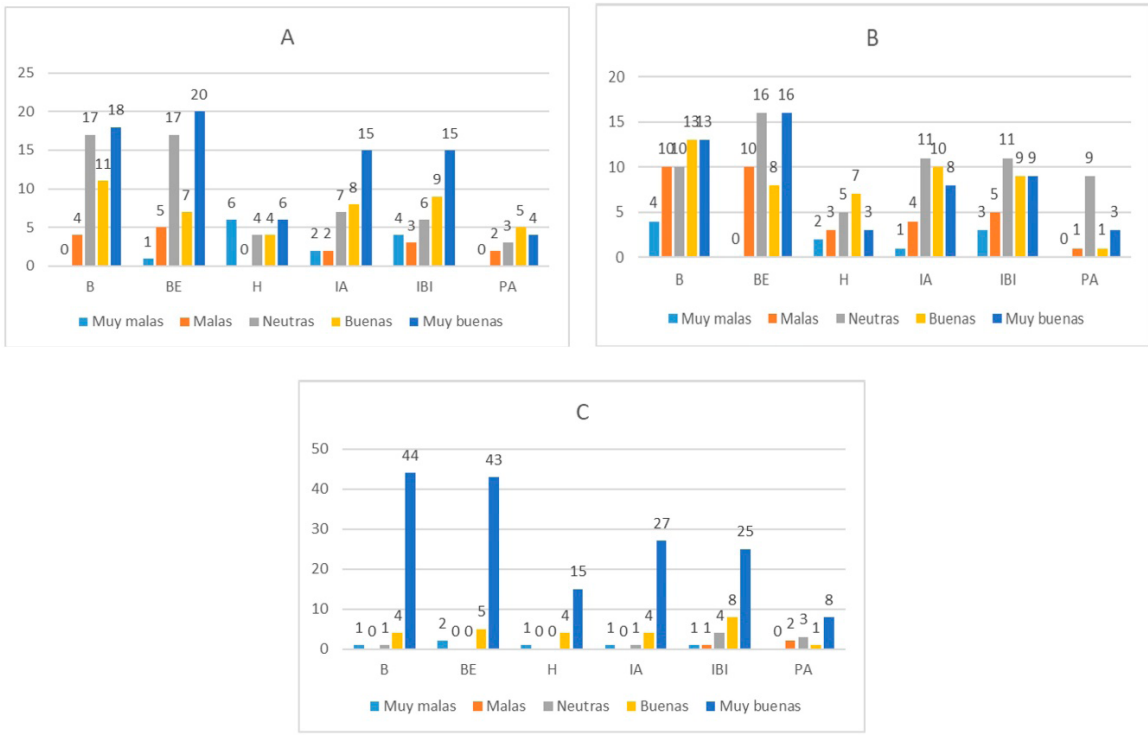


Figura 6: Respuestas recibidas para los ítems 22 (A), 25 (B) y 26 (C). Para la asignación de valores numéricos se consideró el ordenamiento normal.
Figure 6. Responses received for items 22 (A), 25 (B) and 26 (C). For the assignment of numerical values, the normal ordering was considered.

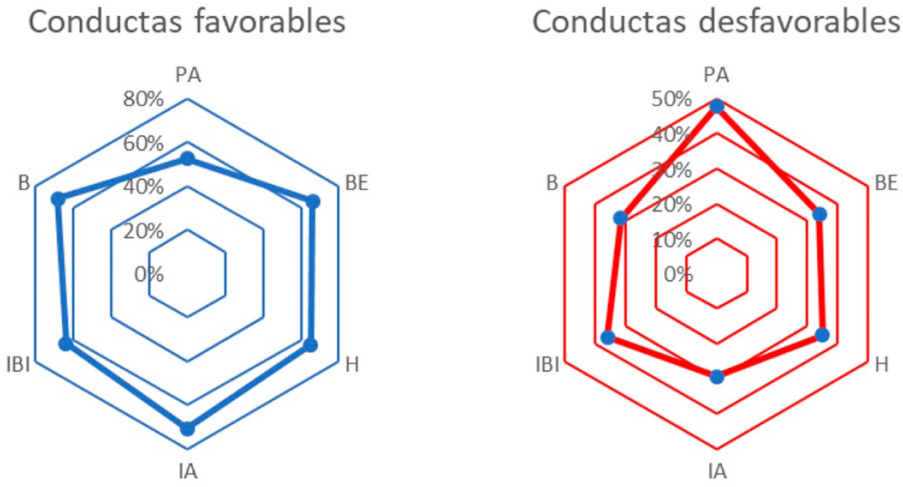


Figura 7. Porcentaje de alumnos de las diferentes licenciaturas con conductas consideradas como favorables o desfavorables. Se presentaron conductas favorables en más del 50 % de los alumnos encuestados, con excepción de PA con una proporción igual para ambos tipos de conductas.
Figure 7. Percentage of students from the different study programs with behaviors considered favorable or unfavorable. Favorable behaviors were present in more than 50 % of the students surveyed, with the exception of PA with an equal proportion for both types of behaviors.

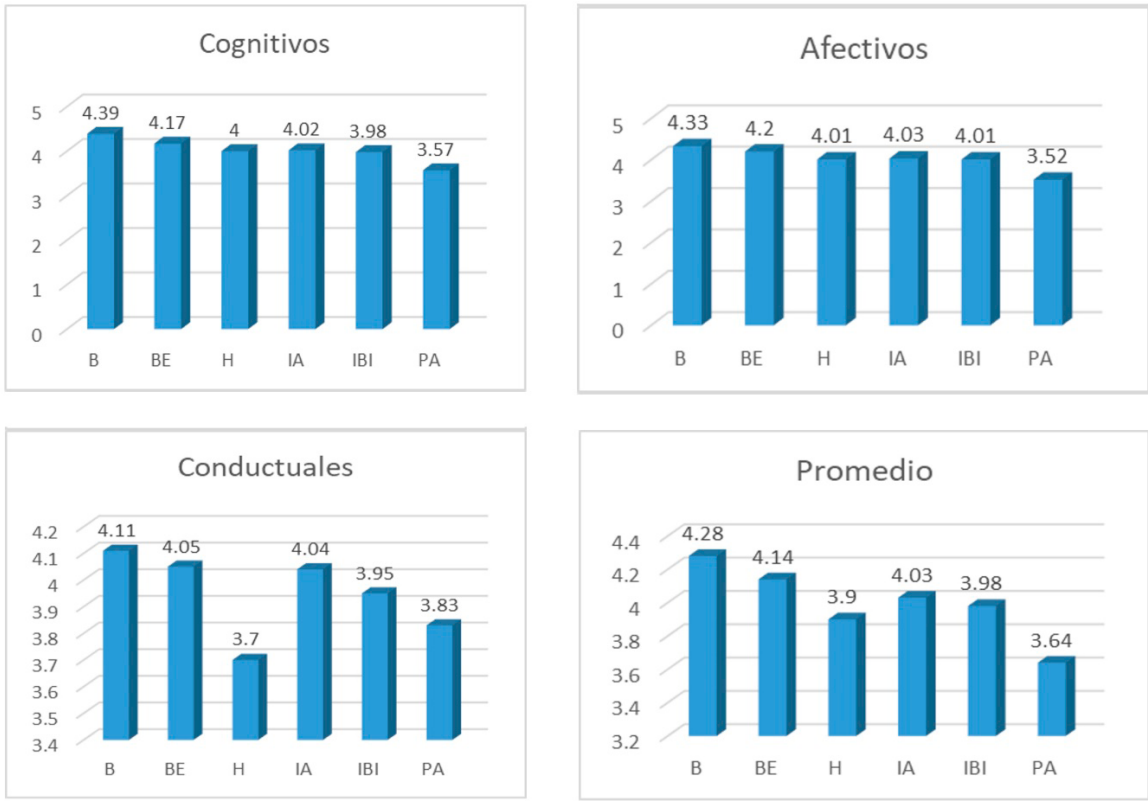


Figura 8. Puntajes obtenidos para los componentes cognitivos (A), afectivos (B) y conductuales (C), así como la calificación promedio (D) para los alumnos de cada licenciatura.
Figure 8. Scores obtained for the cognitive (A), affective (B) and behavioral (C) components, as well as the average grade (D) for students in each degree program.

Cuando se analizan los resultados por categorías, la parte cognitiva parece ser homogénea en todas las licenciaturas, aunque nuevamente PA obtiene el puntaje más bajo. Este resultado se reproduce para el caso de los componentes afectivos, donde nuevamente B representa los puntajes más elevados y PA los más bajos. Sin embargo, cuando se revisan los componentes conductuales, las diferencias son más notorias ya que, por una parte, los puntajes son menores, y por otra los alumnos de H muestran una proporción menor de conductas favorables, incluso por debajo de los de PA.

Al plantear los resultados en términos porcentuales (Figura 9), alrededor del 60 % de los alumnos de la DCBS presenta una actitud favorable hacia la bioética. Nuevamente, los alumnos de PA parecen ser los menos enfocados hacia actitudes bioéticamente favorables, en la forma en que se conceptualizó en este estudio.

En el trabajo realizado anteriormente (Contreras Islas *et al*., 2016), los resultados mostraron que más del 65 % de los alumnos de la DCBS presentaba una actitud favorable hacia la bioética como es entendida dentro de los lineamientos de la Comisión de Ética, una proporción que no parece haber cambiado de manera significativa en estos años. En aquel momento, B presentó el mayor porcentaje (79 %), mientras que sólo el 67 % de los alumnos de IBI presentaron este tipo de actitudes. Si bien los alumnos de PA obtuvieron valores bajos (60 %), éstos fueron mayores a los de las Ingenierías, que se mantuvieron en niveles semejantes a los obtenidos en el estudio actual.

Los resultados obtenidos en este trabajo se prestan para diferentes interpretaciones. Primero que nada, es posible asumir que, aunque la comunidad de alumnos de licenciatura de la DCBS presenta, en efecto, actitudes favorables a la visión de bioética de la propia institución, esta última ha contribuido muy poco a fomentar dicho aspecto dentro de la formación de aquéllos, si se considera para ello el porcentaje de UEA que presenta recurrencias con respecto a las palabras clave generales., una situación que incluso empeoró cuando se consideran los planes de estudio actualmente vigentes. Sin embargo, no puede descartarse del todo que la formulación de los ítems, o su interpretación por parte de los encuestados, pudieran afectar los resultados.

En la mayoría de los casos, la buena disposición ante cuestiones bioéticas por parte de los alumnos se deberá entonces, probablemente, a otros factores como intereses personales u otros factores presentes en su entorno social que contribuyen a configurar sus actitudes bioéticamente favorables desde un paradigma educativo mayormente informal, aun cuando la disposición de incluir estos temas como parte de su formación profesional sea muy favorable, como muestran las respuestas recibidas a la pregunta específicamente dirigida a ello.

Otra interpretación sale a relucir cuando se relaciona lo anterior con el gran porcentaje de respuestas desfavorables

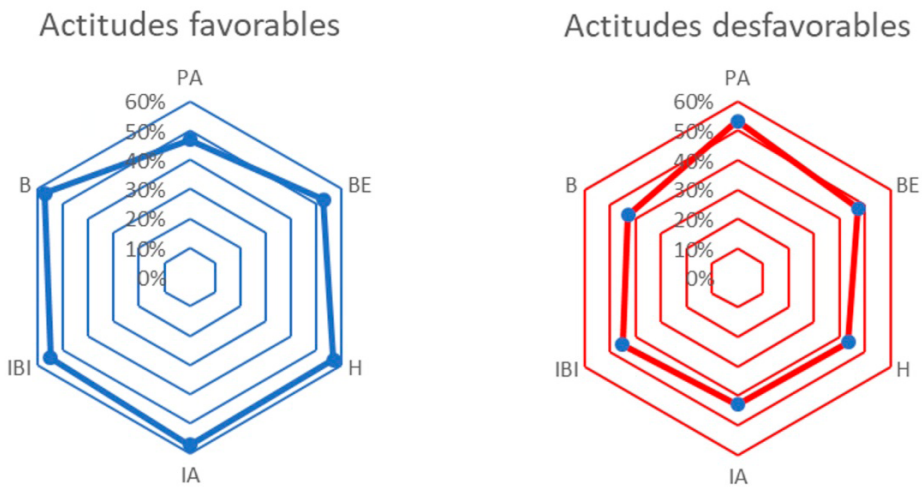


Figura 9. Porcentaje de alumnos de las diferentes licenciaturas con actitudes consideradas como favorables o desfavorables. Se presentaron actitudes favorables en más del 50% de los alumnos encuestados, con excepción de PA, que presenta una proporción igual para ambos tipos de actitudes.
Figure 9. Percentage of students from the different degree programs with attitudes considered favorable or unfavorable. Favorable attitudes were present in more than 50% of the students surveyed, with the exception of PA, which presents an equal proportion for both types of attitudes.

recibidas para el ítem 17 (*Nadie se toma en serio las regulaciones bioéticas*) para el cual el análisis estadístico no consideró significativo para el análisis. A pesar de esto, las respuestas a dicho ítem invitan a reflexionar e indagar sobre qué experiencias concretas dentro de la vida de los alumnos los llevaron a emitir semejantes respuestas. ¿Han sido situaciones que viven de forma cotidiana dentro de sus actividades en la DCBS, en la UAM o, en general, en los ámbitos más personales de su entorno sociocultural? ¿Tendrá alguna relación con la falta de información que la mayoría de los encuestados encuentran dentro de su formación académica en la universidad? Sin duda hace falta más información para poder aventurar una respuesta a estas interrogantes. Sin embargo, la situación invita a reflexionar sobre el papel que la propia DCBS, o incluso la Comisión de Ética, podría o debería tomar en la difusión de estos temas entre los miembros de la comunidad.

Si la presencia de temáticas bioéticas en los programas de las UEA de los planes de estudio de cada licenciatura fuera por sí sola una garantía de que dicha información repercutirá en un cambio en sus actitudes, podríamos esperar una cierta relación entre el porcentaje de UEA con contenido bioético dentro del plan de cada licenciatura y el porcentaje de sus alumnos con actitudes bioéticas favorables.

Sin embargo, como se puede observar al comparar los resultados mostrados en la Tabla 2 y al Figura 9, se hace evidente que dicha correlación no existe, o al menos no es lo suficientemente clara, pues licenciaturas que presentaron porcentajes altos de contenido en materia de bioética (incluso a nivel de palabras clave específicas) como PA (29 %), presentan la menor proporción de actitudes favorables, así como el menor puntaje promedio (Figura 8).

Todo lo anterior sugiere que las actitudes, conocimientos y, en general, nociones de bioética de los alumnos no guardan relación con el contenido de planes y programas oficiales. De hecho, es probable que no se base en ellos en absoluto, aun cuando los propios alumnos consideran que estos temas deberían formar parte de su preparación como profesionales de las ciencias biológicas y de la salud, un elemento que apoya la noción apoyada por la UNESCO de que las cuestiones (bio)éticas se aprenden a través de la experiencia más que de la teoría (UNESCO, 2003).

Entonces, la buena noticia, es que los alumnos presentan en general una actitud positiva hacia los temas bioéticos, pero la mala es que la División hace muy poco para aprovechar, incentivar y dirigir estas predisposiciones de los alumnos. Esta apreciación ya había sido señalada en el trabajo anterior (Contreras *et al*., 2016) y en ese trabajo se habían sugerido acciones que la DCBS o bien la propia Comisión de Ética podrían tomar para hacer frente a esta situación.

A la fecha el único cambio previsible a corto plazo es la aprobación de una UEA (Bioética) como parte del TG, para todas las licenciaturas de la División, una modificación curricular que actualmente se encuentra todavía en proceso.

CONCLUSIONES

Los objetivos planteados para la realización de este trabajo fueron cuatro: primero conocer las actitudes de los alumnos en cuestiones bioéticas, segundo identificar diferencias entre las licenciaturas, tercero determinar si las actitudes de los alumnos eran coherentes con la visión de la Comisión de Ética y, finalmente, ver si dichas actitudes y conocimientos podían relacionarse con los contenidos de los planes y programas de estudio, los cuales se han venido ajustando en el periodo entre ambos estudios.

Al respecto, los resultados obtenidos y discutidos hasta el momento muestran un panorama general de las actitudes

de los alumnos en materia de bioética y permiten, en efecto, observar algunas diferencias entre los alumnos de las distintas licenciaturas, si bien la actitud de la mayoría los alumnos parecería ser coherente con la visión de bioética planteada por la Comisión de Ética de la DCBS en sus documentos oficiales.

Por último, se puede decir que los contenidos oficiales de los planes de estudio han tenido muy poco que ver con la adquisición de las actitudes por parte de los alumnos, ya que las diferencias en las actitudes de bioética de los alumnos de cada licenciatura no parecen relacionarse de manera clara con los objetivos y contenidos sintéticos planteados en los planes y programas de estudio.

En el estudio actual llama la atención que el porcentaje de alumnos con conocimientos favorables disminuyó significativamente, aunque el porcentaje de coincidencias y recurrencia en los planes y programas de estudio se incrementó ligeramente con respecto a los vigentes en 2012. La buena noticia, es que los alumnos presentan actitudes, visiones parecidas a las de la División y, en general, una buena disposición hacia las temáticas bioéticas. La mala, que la División parece no hacer suficiente para aprovechar, incentivar y dirigir estas predisposiciones de los alumnos. Futuras investigaciones podrían enfocarse en las prácticas pedagógicas en el aula, como el espacio en el que los contenidos curriculares se conectan con la formación en bioética de los alumnos. Por ejemplo, sería interesante analizar los procesos educativos en las aulas desde una perspectiva de bioética usando métodos videográficos o etnográficos.

Sería ideal poder desarrollar, con base en estudios semejantes, una serie de estrategias que permitieran promover y orientar el desarrollo de las inquietudes de los alumnos en esta área en coherencia con la visión y los ideales de la universidad, pudiendo convertirse, incluso, en un distintivo de la formación de los alumnos de nuestra División ante la sociedad.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

Álvarez Díaz, J.A. 2015. Problemas éticos en reproducción humana. En: Salud, condiciones de vida y políticas sociales. Miradas sobre México. López Arellano, O. y Peña Saint Martin F. (Coords.), pp. 19-42. Ciudad de México: Alames Promep.

Álvarez Díaz, J.A. 2021. Plaguicidas y bioética. En: Plaguicidas y salud en Cojumatlán de Régules, Michoacán, México. Ochoa Ocaña, M.A. y Gómez Arroyo, S. (Coords.), pp. 20-42. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Ander-Egg, E. 1995. Técnicas de investigación social. Buenos Aires: Editorial LUMEN.

Andino, C. 2015. El lugar de la ética entre los saberes técnicos. Un abordaje filosófico. Revista Científica de la UCSA. 2 (2): 85-94 85. https://Doi:10.18004/ucsa/2409-8752/2015.002(02)085-094

Babbie, E. 2000. Fundamentos de la investigación social. Ciudad de México: International Thomson Editores.

Baena, G. 1996. Instrumentos de investigación: tesis y trabajos profesionales. Ciudad de México: Editores Mexicanos Unidos.

Castro de Bustamante, J.C. 2003. Teoría general de las actitudes. Recuperado el 18 de mayo de 2024, de http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8906/02CapituloParteI.pdf?sequence=3

Contreras Islas, D., Kerbel Lifshitz, C., Mendieta Márquez, E., y Pérez Hernández, M. 2016. Bioética y educación en Ciencias Biológicas. Experiencia y perspectivas en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Interciencia. 41(8): 568-572.

Contreras Islas, D., Kerbel Lifshitz, C., Mendieta Márquez, E., y Pérez Hernández, M. 2017a. Diagnóstico de componentes bioéticos en el ámbito educativo de Ciencias Biológicas y de la Salud. Revista Latinoamericana de Bioética. 17 (1): 14-35. http://dx.doi.org/10.18359/rlbi.2137

Contreras Islas, D.S., Kerbel Lifshitz, C., Mendieta Márquez, E., y Pérez Hernández, M.A. 2017b. La bioética en planes y programas de estudio de la licenciatura de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la UAM-Iztapalapa. En Encuentro Nacional de Ambientalización Curricular en la Educación Superior. Ciudad de México.

Contreras Islas, D.S. 2018. Bioética, innovación y diseño curricular en la Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Repositorio Institucional de la UAM-Xochimilco. https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/2291

González Valenzuela, J., y Linares Salgado, J.E. (Coords.). 2013. Diálogos de bioética. Nuevos saberes y valores de la vida. Ciudad de México: Fondo de Cultura Económica-UNAM.

Hirsch Adler, A. 2020. Dilemas éticos expresados por académicos de la Universidad Nacional Autónoma de México. Sinéctica. 54. Recuperado el 18 de mayo de 2024 de https://sinectica.iteso.mx/index.php/SINECTICA/article/view/1025

Hortal, A. 2010. Ética General de las profesiones. Bilbao: Desclée De Brouwer/ Unijes Universidad Jesuita.

Méndez Hinojosa, L.M., y Peña Moreno, J.A. 2006. Manual práctico para el diseño de la escala de Likert. Ciudad de México: Trillas.

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 2003. Report of the Working Group on the Teaching of Ethics of the World Comission of the Ethics of Scientific Knowledge and Technology (COMEST). Paris: UNESCO.

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 2015. Global Bioethics: What for? Twentieth anniversary of UNESCO's Bioethics Programme. Paris: UNESCO.

Potter, V.R. 1971. Bioethics. Bridge to the future. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.

Rojas Tejada, A., Fernández Prados, J.S., y Pérez Meléndez, C. 1998. Investigar mediante encuestas. Fundamentos teóricos y aspectos prácticos. Madrid: Editorial Síntesis.

Sánchez Fernández, S., y Mesa Franco, M.C. 1998. Actitudes hacia la tolerancia y la cooperación en ambientes multiculturales. Evaluación e intervención educativa en un contexto concreto: la ciudad de Melilla. Granada: Editorial Universidad de Granada.

Sulbarán, D. 2009. Medición de actitudes. Caracas: Editorial de la Universidad Central de Venezuela.

Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). 2010. Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Recuperado el 18 de mayo de 2024 de https://cbs.izt.uam.mx/consejo/index.php/institucional#lineamientos-para-la-conduccion-etica-de-la-investigacion-la-docencia-y-la-difusion-2010

Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). 2010. Reglamento Interno de la Comisión de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Recuperado el 18 de mayo de 2024 de https://cbs.izt.uam.mx/consejo/index.php/institucional#reglamento-interno-de-la-comision-de-etica

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo de Revisión

Bases jurídicas, normativas y éticas de la investigación en seres humanos, en México

Regulations and ethical bases in research involving human beings in Mexico

Maria del Carmen Candia Plata*, Diana Judith Leverda González, Mariana Pacheco Quiroz, Oswaldo Humberto Vázquez Medina, Gerardo Álvarez Hernandez y Luis Fernando López Soto
Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud, Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S / N, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.

ABSTRACT
Medical research involving human subjects requires regulations that hierarchize human rights above all scientific interest. Over 70 years ago and following regrettable human research practices, several documents that guide ethical operation of research practices involving human beings were amended internationally. Following these international standings, Mexico developed several ethical, regulatory, and legal documents that must be applied in a national level in all research involving human beings. This paper seeks to present the general regulatory framework for research involving human subjects in Mexico to facilitate its incorporation into the organic structure of medical establishments, research centers and Mexican universities that do not have a health research organization based on regulation or which requires updating.
Keywords: Clinical research regulation for Mexico; Ethical research bases; Research involving human beings.

RESUMEN
El antecedente de lamentables prácticas de investigación en seres humanos registrado hace más de 70 años fue el origen de los acuerdos y regulaciones internacionales actuales en esta materia. En México, la legislación sobre investigación en salud se adhiere al marco regulatorio y principios internacionales de ética en investigación en seres humanos. Dicha legislación reconoce los beneficios científicos y sociales de la investigación en salud, antepone los derechos de los sujetos de investigación al interés de progreso científico y se inscribe en un marco regulatorio integrado por leyes y reglamentos aprobados por el Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, así como normas y guías expedidas por órganos desconcentrados federales, técnica y operativamente autónomos. En este trabajo, se proporciona una visión global del marco regulatorio de orden superior vigente en México, así como de las atribuciones generales de las distintas dependencias federales en materia de investigación en salud, con el objetivo de facilitar la incorporación inicial de sus distintos elementos a la estructura orgánica de los establecimientos médicos, centros de investigación y universidades mexicanas que aún no cuentan con una organización interna basada en la norma o que necesitan actualizarla.

*Autor para correspondencia: Maria del Carmen Candia Plata
Correo-e: carmen.candia@unison.mx
Recibido: 1 de febrero de 2024
Aceptado: 5 de Marzo de 2024
Publicado: 4 de Abril de 2024

Palabras clave: Bases jurídicas de la investigación clínica en México; Ética de la investigación; Investigación en humanos.

INTRODUCCIÓN
La regulación internacional y los principios de ética en investigación en seres humanos iniciaron su desarrollo hace más de 70 años, a partir de la difusión de los múltiples casos de víctimas de experimentos no éticos realizados en humanos durante la segunda guerra mundial (Harkness, 1996). Las décadas subsiguientes abrieron paso a las iniciativas globales dirigidas principalmente al fortalecimiento del marco ético de la investigación en seres humanos (Nagai *et al.*, 2022). En México, la regulación sobre investigación en humanos es cada vez más robusta y se ha desarrollado en un marco concordante con la regulación y los principios internacionales de ética en investigación en salud, reconociendo los beneficios científicos y sociales de este tipo de investigación, pero destacando la necesidad de anteponer los derechos de los sujetos de investigación a la de progreso científico (Secretaría de Salud, 2018).

Actualmente, los establecimientos autorizados en México para realizar estudios en humanos funcionan con criterios de operación ajustados a principios jurídicos, normativos y éticos que garantizan la prevalencia del criterio del respeto a la dignidad humana, la protección de los derechos y el bienestar de los sujetos de investigación, sobre cualquier otro interés de la ciencia y la sociedad (Secretaría de Salud, 2024). No obstante, no todos los establecimientos e investigadores que realizan estudios en seres humanos han logrado incorporar a su práctica dichos preceptos. Por lo anterior, en este trabajo se proporciona una visión global del marco regulatorio de orden superior vigente en México, así como de las atribuciones generales de las distintas dependencias federales en materia de investigación en salud, con el objetivo de facilitar la incorporación inicial de sus distintos elementos a la estructura orgánica de los establecimientos médicos, centros de investigación y universidades mexicanas que aún no cuentan con una organización interna basada en la norma o que necesitan actualizarla.

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2252

Declaraciones y pautas éticas para la investigación en salud

La evolución de la normatividad en materia de investigación en salud en México ha sido el resultado de la incorporación progresiva de los principios de investigación universalmente aceptados (López-Pacheco *et al.*, 2016). Dichos principios promueven el respeto y la protección de los sujetos de investigación, así como la prevención de daños en poblaciones marginadas y vulnerables, y deben ser considerados en todos los actos de investigación en salud en seres humanos (The importance of universal ethical standards in science, 2022). Su desarrollo, ha contribuido significativamente a la definición de los límites de la investigación en seres humanos, gracias a documentos de alta relevancia histórica como el Código de Nüremberg (1947) creado para establecer los primeros acuerdos internacionales para la investigación con seres humanos, derivados de la revisión de los cargos contra médicos Nazis por haber conducido experimentos humanos no éticos durante la segunda guerra mundial (Código de Nuremberg, 1947); la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 1964) y sus enmiendas (la versión actual oficial es la del año 2013), con las que la Asociación Médica Mundial buscó orientar a los profesionales que realizan investigación en salud en humanos (World Medical Association, 2024); el Informe Belmont, creado en 1979 por el congreso de los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) tras las atrocidades infringidas a una población vulnerable de Alabama, EUA, durante el Experimento Tuskegee (Organización Panamericana de la Salud, 2024) y actualizado por última vez en el año 2022 (USA. Department of Health and Human Services, 2024); la Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos, primer documento en establecer los estándares éticos para la investigación médica y biológica a escala global (UNESCO, 2006) y las Pautas éticas internacionales para investigación relacionada con salud con seres humanos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, tanto en su versión para las Américas publicada por la Organización Panamericana de la Salud y el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), en el 2017, como en la versión ICH, E6-R2 de la Conferencia Internacional de Armonización (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2016), que por iniciativa de la OMS explican cómo aplicar la ética a la investigación en seres humanos. Otros documentos internacionales relevantes en materia de ética en investigación que han sido considerados para construir la normatividad en México, se enlistan en la tabla 1, con el fin de que los lectores identifiquen documentos específicos de su interés.

En México, la coordinación de la investigación en salud es materia de salubridad

En la legislación mexicana, los objetivos de la investigación en salud se han definido en términos del derecho a la salud de los individuos y de las poblaciones (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. Ley General de Salud, 1984) y han sido determinantes para que la coordinación de la investigación en salud sea materia de salubridad. Esto significa, que la investigación en salud y en particular la que se realiza en seres humanos, no solo debe contribuir al progreso de la medicina sino incidir favorablemente en la salud de las personas y las poblaciones. También significa que la investigación en humanos, como parte de la investigación en salud, solo se justifica cuando el conocimiento que se pretende producir no puede obtenerse por otro medio, se tiene una seguridad razonable de que los sujetos que participan en la investigación no están expuestos a riesgos éticamente inaceptables (Weindling *et al.*, 2016) y se han priorizado los derechos de los sujetos de investigación a la necesidad de progreso científico, político, profesional o comercial (Kamolz and Hartmann, 2021; Kayser and Ramzan, 2021).

Para lograr los citados objetivos, las instituciones e investigadores de México que realizan investigación en salud deben conocer la regulación nacional y contar con comités para dictaminar internamente los protocolos de investigación propuestos por sus investigadores, especialmente cuando tienen el interés de solicitar la autorización de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), único organismo en México con facultades para expedir, prorrogar o en su defecto revocar los permisos para la realización de proyectos de investigación en humanos. Además, la comunidad científica de todos los campos relacionados con la investigación en salud debe contar con información para identificar en la regulación nacional los elementos indispensables para proteger los derechos y alcanzar el bienestar de los sujetos de investigación que involucran en los proyectos.

Regulación y normatividad nacional en investigación para la salud

El marco regulatorio de orden superior está integrado por la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1917), Ley General de Salud (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984), el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1987) y la Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 2023). Además, existen normas oficiales mexicanas y guías expedidas por la Secretaría de Salud, a través del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación, Desarrollo, Tecnologías e Información en Salud de la Secretaría de Salud, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (México. COFEPRIS, 2018) y la Comisión Nacional de Bioética (México. CONBIOÉTICA, 2024) instancias que promueven, con un carácter vinculante, la observancia de buenas prácticas, valores y principios éticos en la investigación en salud.

La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos es la carta magna que rige jurídicamente nuestro país

Tabla 1. Documentos internacionales relevantes en materia de ética en investigación.
Table 1. Relevant international documents on research ethics.

Documento	Breve descripción
Código de Nüremberg	**Destaca la relevancia de: 1) obtener el consentimiento informado y voluntario de los sujetos de investigación antes de su participación en el estudio, 2) evitar cualquier sufrimiento físico y mental innecesario, 3) contar con evidencia experimental de que el estudio en humanos es necesario y se traducirá en un beneficio social (Código de Nüremberg, 1947).**
Declaración universal de los derechos humanos	**Declaración de los derechos humanos fundamentales, promulgada en 1948 como el ideal común para todos los pueblos y naciones (Organización de las Naciones Unidas, 1948).**
Declaración de Helsinki	**Publicada en 1964 (World Medical Association, 1964), introdujo el paradigma de la revisión de los protocolos de investigación por comités de ética, así como la regulación del uso de placebos y las garantías para la continuidad de los tratamientos. Es el marco de referencia global en materia de regulaciones éticas para la investigación en seres humanos y ha sufrido actualizaciones hasta el año 2013 (World Medical Association, 2024).**
Informe Belmont	**Informe publicado en 1979 (The National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research, 1979) como punto de partida para el análisis y resolución de los problemas éticos que surgen de la investigación con seres humanos, basados en la explicación y unificación de tres principios éticos básicos que continúan siendo una referencia para el trabajo ético en investigación en seres humanos: 1) *Respeto* a la autonomía de los sujetos de investigación, 2) Protección de los sujetos de investigación ante cualquier daño mayor al mínimo (*Beneficiencia*) y, 3) Aplicación de procedimientos razonables y correctamente administrados, con un costo-beneficio razonable (*Justicia*). La última actualización es la del año 2022 (Department of Health and Human Services, 2024).**
Pautas Éticas Internacionales para la Evaluación Ética de Estudios Epidemiológicos (CIOMS)	**Publicadas por primera vez en 1991. Tienen el objetivo de adaptar los principios éticos ya existentes a la práctica de investigación epidemiológica. Su última actualización fue en el año 2009 (Organización Panamericana de la Salud y Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 2009).**
Normas de Buena Práctica Clínica ICH E6 (R2)	**Norma internacional de intención ética y científica que busca de proteger los derechos de los sujetos de investigación en ensayos clínicos, así como de garantizar la credibilidad de los datos obtenidos. Ha facilitado acuerdos entre la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos de América (ICH, 2016).**
Declaración sobre las responsabilidades de las generaciones actuales con las generaciones futuras (UNESCO)	**Declaración realizada por la UNESCO en el año 1997 con el fin de promover la solidaridad intergeneracional, salvaguardar los intereses y necesidades de las futuras generaciones, con especial atención a temas del medio ambiente y dignidad humana (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), 1997).**
Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina "Convención de Oviedo"	**Convenio publicado en 1997 con la finalidad de proteger la dignidad y los derechos fundamentales del ser humano en el ámbito de las aplicaciones de Biología y Medicina. Fue actualizado mediante la incorporación de protocolos para el análisis genético médico, el trasplante de tejidos humanos y la prohibición de la clonación de humanos (Consejo de Europa, 2008).**
Declaración universal sobre el genoma humano y los derechos humanos	**Instrumento universal publicado en 1997 por las Naciones Unidas sobre la investigación en el genoma humano y sus diversas aplicaciones para el mejoramiento de la salud (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), 1997).**
Guías operacionales para Comités de Ética que evalúan la investigación biomédica (OMS)	**Guías publicadas en el año 2000 como la base del desarrollo de procedimientos escritos por los comités de ética en investigación y la definición de las funciones de la investigación biomédica (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2000).**
Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Relacionada con la Salud con Seres Humanos (CIOMS)	**Fueron creadas en 1982 por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), en colaboración con la OMS, con el fin de proporcionar principios éticos aceptados a nivel internacional y la manera de aplicarlos, en particular en entornos de escasos recursos. La versión más actualizada es la del 2016 (Organización Panamericana de la Salud, 2017).**
Ética de la investigación relativa a la atención sanitaria en los países en desarrollo	**Informe que marca las pautas éticas a seguir cuando la investigación se hace en poblaciones pobres, pero es patrocinada por países desarrollados (Nuffield Council on Bioethics, 2005).**
Declaración internacional sobre los datos genéticos humanos, UNESCO 2003	**Declaración sobre las normas éticas, científicas y organizativas que se deben seguir al manejar datos genéticos, proteómicos y muestras biológicas de donde estos datos provengan (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), 2003).**
Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos	**Aprobada en 2005, es un documento en donde los países pertenecientes a la UNESCO se comprometieron a respetar y aplicar los principios fundamentales de la bioética reunidos en el texto (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), 2006).**

Documento	Breve descripción
Handbook for good clinical research practice: guidance for implementation.	**Publicado en 2005 con la finalidad de ayudar a las autoridades regulatorias internacionales a implementar las buenas prácticas clínicas en el desarrollo de investigación en seres humanos de cualquier tipo (Organización Mundial de la Salud, 2005).**
Buenas Prácticas Clínicas: Documento de las Américas	**Documento creado con el objetivo de proponer guías para las Buenas Prácticas Clínicas en los países de América que no son parte de la Conferencia Internacional de Armonización (Organización Panamericana de la Salud, 2005).**
Declaración de Singapur	**Es una guía internacional que establece los principios y responsabilidades fundamentales a considerar cuando se realiza investigación, resultado de los acuerdos de la Conferencia Mundial sobre Integridad en Investigación, realizada en Singapur en 2010. (World Conferences on Research Integrity, 2022).**
Pautas y orientación operativa para la revisión ética de la investigación en salud con seres humanos	**Documento orientador dirigido a comités de ética en investigación e investigadores que busca mejorar las pautas de revisión ética (Organización Panamericana de la Salud, 2012).**
Código de conducta internacional para colaboraciones equitativas en investigación.	**Es una guía para la investigación del proyecto TRUST, que busca promover la equidad al realizar investigación con sujetos de altos y bajos ingresos, así como prevenir las investigaciones desleales (The TRUST Code, 2018).**

y define tanto las atribuciones y relaciones de los poderes del gobierno federal como los derechos de los ciudadanos (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1917). De este instrumento de orden superior, deriva la Ley General de Salud, que establece que el respeto a los derechos de las personas que son sujetos de estudio está por encima de la necesidad de progreso científico (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984) y define los límites de la investigación en salud en México, a través de su reglamento en materia de investigación para la salud (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1987).

De acuerdo con la Ley General de Salud (LGS), la investigación en salud incluye el desarrollo de acciones para ampliar el conocimiento de los procesos biológicos y psicológicos de los seres humanos, así como estudiar las causas de sus enfermedades, la relación entre la salud, estructura social y medioambiental, los mecanismos, técnicas, métodos e insumos para la prevención, diagnóstico, tratamiento y control de los problemas de salud de la población (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984). En esta ley, se definen las bases legales para la autorización, desarrollo y coordinación de la investigación en humanos o en muestras biológicas humanas. También se establece la necesidad de que la investigación en seres humanos sea realizada por profesionales de la salud, en establecimientos que actúen bajo la vigilancia de las autoridades sanitarias competentes, y sea autorizada sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro método idóneo y exista una razonable seguridad de que los sujetos de investigación no se expondrán a riesgos innecesarios (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984). En su actualización del año 2022, la LGS incluyó además los elementos que deben ser tomados en cuenta en proyectos sobre el genoma humano (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984).

La LGS también señala que cualquier establecimiento del sector público, social o privado que realice investigación en salud debe contar con tres tipos de comités para evaluar y dictaminar internamente los protocolos de investigación propuestos por sus investigadores: 1) un comité de investigación, para revisar y dictaminar la originalidad, relevancia y factibilidad de los protocolos de investigación; 2) un comité de ética en investigación, para revisar, dictaminar y formular recomendaciones de carácter ético a los protocolos de investigación y, 3) un comité de bioseguridad, para revisar, dictaminar y brindar recomendaciones sobre las condiciones de funcionamiento de las áreas implicadas en los protocolos de investigación, para prevenir riesgos en la bioseguridad de los sujetos de investigación y emitir recomendaciones basadas en las disposiciones vigentes (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1984).

En la esfera administrativa, el instrumento que establece cómo debe cumplirse la Ley General de Salud en lo referente a la investigación para la salud, en los sectores público, social y privado, es el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (RLGSMIS; México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 1987). Este reglamento identifica la investigación para la salud como un factor determinante para mejorar las acciones encaminadas a proteger, promover y restaurar la salud del individuo y de la sociedad en general, y también precisa los criterios técnicos necesarios para la correcta utilización de los recursos destinados a la investigación en salud y para la atención de los elementos científicos y éticos que garanticen la obtención de resultados confiables, respetando la dignidad y el bienestar de las personas sujetas a investigación. Con base en lo anterior, consideramos que la lectura longitudinal la LGS y el RLGSMIS, proporcionará al lector la visión inicial requerida para comprender la regulación en materia de investigación en salud en México expresada en documentos expedidos por el Ejecutivo Federal que contienen disposiciones operadas a

través de órganos desconcentrados como la CONBIOETICA y la COFEPRIS.

Entre las disposiciones más importantes, se encuentran las que definen la integración y el funcionamiento de los comités de ética en investigación que, de conformidad con los criterios establecidos por la Comisión Nacional de Bioética siguen las Disposiciones Generales para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación 2012 (DOF, 2020) y la Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación de la CONBIOÉTICA (Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA), 2018). Esta guía se adhiere a la normatividad internacional y promueve, con un carácter vinculante, un marco conceptual y operativo para la observancia de valores y principios éticos en la investigación en salud definidos en la LGS y en el RLGSMIS, además de establecer los criterios para la organización y funcionamiento de los comités de ética en investigación en los establecimientos médicos, universidades y centros de investigación que realicen investigación en seres humanos (Comisión Nacional de Bioética 2015 y 2018).

Actualmente, la mayoría de los establecimientos médicos del Sistema Nacional de Salud cuenta con los tres tipos de comités que señala la LGS (investigación, ética en investigación y bioseguridad), por lo que además de dictaminar sus propios proyectos algunos de ellos funcionan como unidades habilitadas para la emisión de pre-dictámenes para el registro de protocolos de investigación ante la COFEPRIS (México. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 2018). Sin embargo, de acuerdo con la investigación de campo que realizó nuestro equipo de trabajo, menos del 5% de las universidades cuenta con comités para dictaminar los protocolos de investigación de sus investigadores (Tabla 2) a pesar de que, por su organización y normatividad interna todas las instituciones educativas y de investigación de nivel superior pueden competir por fondos para el fomento a la investigación en nuestro país (México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación, 2023).

Por otro lado, las normas oficiales mexicanas en materia de investigación en salud son los instrumentos que establecen en México los criterios técnicos y metodológicos para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Entre ellas, se recomienda la lectura minuciosa de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 (DOF, 2012), en la que se describen los criterios para la ejecución de proyectos de investigación en seres humanos. En conjunto con el RLGSMIS y la Guía de Buenas Prácticas Clínicas en la Investigación en Salud, las normas oficiales mexicanas en materia de investigación en salud son de observancia obligatoria dentro de la regulación de la investigación establecida por la LGS e instrumentada por la COFEPRIS en todo el país (Secretaría de Salud, 2024). Por esta razón, los investigadores deben tener en cuenta que otras Normas Oficiales Mexicanas, además de la NOM-012-SSA3-2012 (Tabla 3) son relevantes al realizar estudios en seres humanos, por lo que se sugiere su lectura transversal.

Finalmente, la COFEPRIS es el órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud encargado de definir los aspectos regulatorios y los criterios estructurales y metodológicos de las buenas prácticas de investigación en salud. Como parte de sus atribuciones, esta entidad federal autoriza y vigila (supervisa) el desarrollo de protocolos de investigación de los siguientes tipos: 1) estudios enfocados a la investigación de farmacos químicos, biológicos y biotecnológicos; 2) estudios de bioequivalencia; 3) estudios de nuevos recursos, tales como materiales, injertos, trasplantes, prótesis, procedimientos físicos, químicos y quirúrgicos; e 4) investigaciones sin riesgo (observacionales). Revisar el proceso de registro y autorización de protocolos de investigación en seres humanos por la COFEPRIS no es parte del propósito del presente trabajo. No obstante, es importante aclarar que los dictámenes favorables emitidos por comités de ética en investigación, de investigación y de bioseguridad, son elementos indispensables para el registro y autorización de estudios investigación por la COFEPRIS.

Tabla 2. Número de universidades de México con comités de ética en investigación registrados en la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOETICA) o en los Institutos de Salud Nacionales de los Estados Unidos de América (National Institutes of Health) hasta enero de 2024.
Table 2. Number of universities in Mexico with research ethics committees registered in the National Bioethics Commission (CONBIOETICA) or in the National Institutes of Health of the United States of America until January 2024.

Número de universidades a nivel nacional	Universidades con comité de ética en investigación activo registrado en la CONBIOÉTICA	Universidades con comité de ética en investigación activo con registro solo en NIH
1498*	37	7
*Que se encuentran registradas en el Sistema de Información Cultural de México (SIC). Se sumaron universidades que no fueron localizadas en dicho Sistema, porque se localizaron en el registro de la CONBIOÉTICA. NIH: National Institutes of Health (Estados Unidos de América).		

Fuentes: México. Sistema de Información Cultural. 2024; United States Department of Health & Human Services. 2024; México. Comisión Nacional de Bioética. 2024.

Tabla 3. Normas oficiales mexicanas que integran el marco normativo para la investigación en salud.
Table 3. Mexican official standards that form the regulatory framework for health research.

Lista de Normas Oficiales Mexicanas
Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.
Norma Oficial Mexicana NOM-005-SSA3-2018, Que establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios.
Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación en seres humanos.
Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas de infraestructura y equipamiento de hospitales y consultorios de atención médica especializada.
Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios clínicos de Biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de Biocomparabilidad.
Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la farmacovigilancia.
Norma Oficial Mexicana NOM-240-SSA1-2012, Instalación y operación de la tecnovigilancia.
Norma Oficial Mexicana NOM-241-SSA1-2021, Buenas Prácticas de fabricación de dispositivos médicos.

Fuente: México. Gobierno de México. Secretaría de Salud, 2024.

CONCLUSIONES

En México, la mayoría de los establecimientos médicos que realizan investigación en seres humanos cuentan con una estructura interna y procesos para la investigación con estándares nacionales. Sin embargo, no todos los establecimientos que realizan estudios en seres humanos han logrado incorporar a su práctica los elementos jurídicos, normativos y éticos necesarios para garantizar la protección de los sujetos de investigación, así como la calidad de los datos que obtienen en los estudios. En este trabajo se proporcionó una visión global del marco regulatorio de orden superior vigente en México, así como de las atribuciones generales de las distintas dependencias federales en materia de investigación en salud, con el objetivo de facilitar la incorporación inicial de sus distintos elementos a la estructura orgánica de los establecimientos médicos, centros de investigación y universidades mexicanas que aún no cuentan con una organización interna basada en la norma o que necesitan actualizarla.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

Código de Núremberg.1947. Recuperado el 17 de marzo de 2023 de https://eticayseguridad.uc.cl/documentos/cec-artes/legislacion-cecsociales/cec-sociales/225-cod-nurem-cec-sociales/file.html

Consejo de Europa. 2008. Protocolo adicional al Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina relativo a las pruebas genéticas con fines sanitarios. Recuperado el 28 de noviembre del 2023 de https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list?module=treaty-detail&treatynum=203

DOF. 2003. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#gsc.tab=0

DOF. 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5240925&fecha=27/03/2012#gsc.tab=0

DOF. 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5272787

DOF. 2013. NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013#gsc.tab=0

DOF. 2013. NORMA Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, Que establece las características mínimas de infraestructura y equipamiento de hospitales y consultorios de atención médica especializada. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284306&fecha=08/01/2013#gsc.tab=0

DOF. 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-240-SSA1-2012, Instalación y operación de la tecnovigilancia. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5275834&fecha=30/10/2012#gsc.tab=0

DOF. 2013. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. Recuperado el21 de diciembre del 2023 de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0

DOF. 2015. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424575&fecha=05/02/2016#gsc.tab=0

DOF. 2017. NORMA Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la farmacovigilancia. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5490830&fecha=19/07/2017#gsc.tab=0

DOF. 2020. NORMA Oficial Mexicana NOM-005-SSA3-2018, Que establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5596456&fecha=09/07/2020#gsc.tab=0

DOF. 2020. ACUERDO por el que se emiten las Disposiciones Generales para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación y se establecen las unidades hospitalarias que deben contar con ellos, de conformidad con los criterios establecidos por la Comisión Nacional de Bioética. 2012. Diario Oficial de la Federación, última modificación del 10 de diciembre de 2020.

DOF. 2021. NORMA Oficial Mexicana NOM-241-SSA1-2021, Buenas prácticas de fabricación de dispositivos médicos. Recuperado el 21 de diciembre del 2023 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5638793&fecha=20/12/2021#gsc.tab=0

Harkness, J. M. 1996. Nuremberg and the issue of wartime experiments on US prisoners. JAMA. 276(20), 1672. https://doi: 10.1001/jama.1996.03540200058032

ICH. 2016. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Integrated Addendum to E6 (R1): Guideline for Good Clinical Practice E6 (R2). Recuperado el 15 de marzo de 2023 de https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf

Kamolz, L.-P. y Hartmann, B. 2021. A history of burn care. Medicina (Kaunas). 57(6):541. https://doi: 10.3390/medicina57060541

Kayser, V. y Ramzan, I. 2021. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. Hum Vaccin Immunother. 17(12), 5255–5268. https://doi: 10.1080/21645515.2021.1977057

López-Pacheco, M. C., Pimentel-Hernández, C., Rivas-Mirelles, E. y Arredondo- García, J. L. 2016. Normatividad que rige la investigación clínica en seres humanos y requisitos que debe cumplir un centro de investigación para participar en un estudio clínico en México. Acta Pediatr México. 37(3), 175.

México. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2018. Listado de Unidades Habilitadas de Apoyo al Predictamen-UHAP. Recuperado el 19 de marzo de 2023 de https://www.gob.mx/cofepris/documentos/listado-de-unidades-habilitadas-de-apoyo-al-predictamen-uhap

México. Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA). 2015. Comisiones Estatales de Bioética. Lineamientos Operacionales. Recuperado el 12 de diciembre 2023 de https://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/Lineamientos_Operacionales_paginado_con_forros.pdf

México. Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA). 2018. Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación. Recuperado el 22 de mayo de 2023 de https://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/registrocomites/Guia_CEI_paginada_con_forros.pdf

México. Comisión Nacional de Bioética. 2024. Lista de registros Comités de Ética en Investigación emitidos. Recuperado el 28 de enero de 2024 de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/879018/Registros_CEI.030124.pdf

México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. 1917. Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Diario Oficial de la Federación, última modificación del 06 de junio de 2023. Recuperada el 28 de enero de 2024 de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/CPEUM.pdf

México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. 1984. Secretaría de Salud. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación, última modificación del 03 de enero de 2024. Recuperada el 28 de enero de 2024 de https:// www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGS.pdf

México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. 1987. Secretaría de Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial de la Federación, última modificación del 02 de abril de 2014. Recuperado el 12 de marzo de 2023, de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf

México. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos. 2023. Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación. Recuperada el 28 de enero de 2024 de https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGMHCTI.pdf

México. Gobierno de México. Secretaría de Salud, 2024. Recuperado el 26 de enero de 2024 de https:// www.gob.mx/salud/en/documentos/normas-oficiales-mexicanas-9705

México. Sistema de Información Cultural. 2024. Universidades por Estado. Recuperado el 28 de enero de 2024 de https://sic.cultura.gob.mx/lista.php?table=universidad&disciplina&estado_id

Nagai, H., Nakazawa, E. y Akabayashi, A. 2022. The creation of the Belmont Report and its effect on ethical principles: a historical study. Monash Bioeth Rev. https://doi: 10.1007/s40592-022-00165-5

Nuffield Council on Bioethics. 2005. The ethics of research related to healthcare in developing countries: a follow-up discussion paper. Recuperado el 28 de noviembre del 2023 de: https://www.nuffieldbioethics.org/publications/research-in-developing-countries

Organización de las Naciones Unidas. 1948. Declaración universal de los derechos humanos. Recuperada el 28 de enero de 2024 de https://www.ohchr.org/sites/default/files/UDHR/Documents/UDHR_Translations/spn.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 1997. Declaración universal sobre el genoma humano y los derechos humanos. Recuperado el 24 de septiembre de 2023 de https://www.ohchr.org/es/instruments-mechanisms/instruments/universal-declaration-human-genome-and-human-rights

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 2003. Declaración internacional sobre los datos genéticos humanos. Recuperado el 24 de agosto de 2023 de https://es.unesco.org/about-us/legal-affairs/declaracion-internacional-datos-geneticos-humanos

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 1997. Declaración sobre las responsabilidades de las generaciones actuales para con las generaciones futuras. Recuperado el 19 de septiembre de 2023 de https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000146180

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 2005. Declaración universal sobre bioética y derechos humanos. Recuperado el 5 de mayo de 2023 de https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000146180

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2000. Guías operacionales para comités de ética que evalúan la investigación biomédica. Recuperado el 30 de noviembre del 2023 de: https://www.sac.org.ar/wp-content/uploads/2020/11/comite-etica-declaraciones-guias-oms.pdf

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005. Handbook for good clinical research practice (GCP): guidance for implementation. Recuperado el 20 de noviembre del 2023 de: https://media.tghn.org/medialibrary/2011/06/WHO_Handbook_for_GCP.pdf

Organización Panamericana de la Salud. 2005. Buenas Prácticas Clínicas: Documento de las Américas. Recuperado el 5 de mayo de 2023 de https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/BPC-doct-esp.doc

Organización Panamericana de la Salud. 2024. Informe Belmont - Principios eticos y directrices para la proteccion de sujetos humanos de investigacion: Reporte de la Comisión Nacional para la Protección de Sujetos Humanos de Investigación Biomédica y de Comportamiento. Resumen, recuperado el 28 de enero de 2024 de https://www.paho.org/es/documentos/informe-belmont-principios-eticos-directrices-para-proteccion-sujetos-humanos

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2012. Pautas y orientación operativa para la revisión ética de la investigación en salud con seres humanos. Recuperado el 30 de noviembre del 2023 de: https://cec.ucr.ac.cr/sites/default/files/2019-09/Pautas%20y%20guías%20para%20CEC%20de%20WHO%20y%20OPS.pdf

Organización Panamericana de la Salud y Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). 2009. International ethical guidelines for epidemiological studies. Recuperado el 28 de noviembre del 2023 de: https://cioms.ch/publications/product/international-ethical-guidelines-for-epidemiological-studies/

Organización Panamericana de la Salud y Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas. 2017. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos, Cuarta Edición. Ginebra: Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 2016. Recuperado el 26 de enero de 2024 de CIOMS-EthicalGuideline_SP_INTERIOR-FINAL.pdf

Secretaría de Salud. 2024. Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. Recuperado el 28 de enero de 2023, de http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.asp

Secretaría de Salud. 2018. Manual de organización específico de la Comisión Nacional de Bioética. Recuperado el 19 de noviembre de 2023 de https://www.gob.mx/salud/conbioetica/articulos/manual-de-organizacion-especifico-253614?state=published

The importance of universal ethical standards in science. 2022. Am Journal Hum Genet. 109(6), 979-980. https://doi: 10.1016/j.ajhg.2022.05.007.

The National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioural Research. 1979. Belmont Report. Recuperado el 26 de enero de 2024 de https://www.hhs.gov/ohrp/

TRUST. 2018. The TRUST Code – A Global Code of Conduct for Equitable Research Partnerships. https://doi. 10.48508/GCC/2018.05. Recuperado el 28 de noviembre del 2023 de: https://www.globalcodeofconduct.org/wp-content/uploads/2023/06/The_TRUST_Code.pdf

USA. Department of Health and Human Services. 2024. Recuperado el 26 de enero de 2024 de htpp:// www.hhs.gov.

USA. United States Department of Health & Human Services. 2024. Office for Human Research Protections Database. Office for Human Research Protections (OHRP) Database for Registered IORGs & IRBs, Approved FWAs, and Documents Received in Last 60 Days. Recuperado el 28 de enero de 2024 de https://ohrp.cit.nih.gov/search/irbsearch.aspx?styp=bsc

Weindling, P., von Villiez, A., Loewenau, A. y Farron, N. 2016. The victims of unethical human experiments and coerced research under National Socialism. Endeavour. 40(1), 1-6. https://doi: 10.1016/j.endeavour.2015.10.005.

World Medical Association. 1964. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. Recuperada el 14 de diciembre del 2023 de https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/

World Medical Association. 2024. Recuperada el 28 de enero de 2024 de https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Antioxidant, Antiproliferative and Antibacterial Activity of *Phoradendron californicum* Extracts; a Parasitic Plant from Northwestern Mexico

Actividad Antioxidante, Antiproliferativa y Antibacteriana de Extractos de *Phoradendron californicum*; una Planta Parásita del Noroeste de México

Pablo Mendez-Pfeiffer[1], Manuel G Ballesteros-Monrreal[1], Mario Leyva[1], Jesús Ortega-Garcia[1], Beatriz Montaño-Leyva[2], Dora Valencia*[1], Milagros Aguilar-Martinez*[1]

[1] Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, campus Caborca, 83600, Caborca, Sonora, México.

[2] Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, campus Hermosillo, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Phoradendron californicum is a plant native of northwestern Mexico that has been used as a therapeutic alternative. In the present study, methanolic and chloroformic extracts of *P. californicum* were prepared and evaluated for their antioxidant activities, phenolic and flavonoid content, as well as their antiproliferative activity in cancer cells, and antibacterial activity. The methanolic extract presented higher antioxidant activity (IC_{50}: 47.62 ± 2.90 µg/mL) and higher total phenol content (186.45 ± 4.58 mg EQ/g of extract) compared to the chloroformic extract (IC_{50}: > 400 µg/mL and 13.54 ± 1.57 mg EAG/g of extract, respectively); both extracts presented similar content of total flavonoids (19.92 ± 1.84 and 25.55 ± 0.73 mg EQ/g of extract, respectively). On the other hand, the chloroformic extract showed higher antiproliferative activity against evaluated cell lines (HeLa, PC3 and L929) compared to the methanolic extract, while in the antibacterial activity the chloroformic extract presented higher activity against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*, and the methanolic extract was more active against *Salmonella enterica*. The clear difference in the biological activities of both extracts may be due to variations in the chemical composition of each due to the extraction method used. *P. californicum* has potential for the search of new compounds with biological activity.

Keywords: *Phoradendron californicum*; Antiproliferative Activity; Antioxidant Activity; Natural Extracts; Mexican Plants.

RESUMEN

Phoradendron californicum es una planta presente en el noroeste de México que se ha empleado como alternativa terapéutica. En el presente estudio se realizaron extractos metanólicos y clorofórmicos de *P. californicum* y se evaluaron sus actividades antioxidantes, contenido de fenoles y flavonoides, así como su actividad antiproliferativa en células de cáncer. El extracto metanólico presentó mayor actividad antioxidante (IC_{50}: 47.62 ± 2.90 µg/mL) y un mayor contenido de fenoles totales (186.45 ± 4.58 mg EAG/g of extract) en comparación con el extracto clorofórmico (IC_{50}: > 400 µg/mL y 13.54 ± 1.57 mg EAG/g of extract, respectivamente), ambos extractos presentaron contenido similar de flavonoides totales (19.92 ± 1.84 µg/mL y 25.55 ± 0.73 mg EQ/g of extract, respectivamente). Por otra parte, el extracto clorofórmico presentó mayor actividad antiproliferativa en las líneas celulares evaluadas (HeLa, PC3 y L929) en comparación con el extracto metanólico. Mientras tanto el extracto clorofórmico presentó mayor actividad contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, mientras que el extracto metanólico presentó mayor actividad contra *Salmonella entérica*. La clara diferencia en las actividades biológicas de ambos extractos puede deberse a las diferencias en la composición química de cada uno debido al método de extracción utilizado. *P. californicum* tiene potencial para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica.

Palabras clave: *Phoradendron californicum*; Actividad Antiproliferativa; Actividad Antioxidante; Extractos Naturales; Plantas Mexicanas.

INTRODUCTION

In Mexico, different types of native plants have been used for their pharmacological potential, to treat different diseases and constitute part of the traditional pharmacopoeia of various ethnic groups (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2017). Northwest Mexico has a wide variety of medicinal plants with potential biological activities. *Phoradendron californicum*, known as Toji, is an autotrophic hemiparasitic mistletoe, native of the south of California, Nevada and Arizona in the USA, as well as the states of Sonora, Sinaloa and Baja California in Mexico. It is usually found infecting *Prosopis* trees and has been used for treatment of digestive disorders like diarrhea, stomachache, vomiting and kidney stones (Hawksworth and Wiens, 1994; Spurrier and Smith, 2007). Few studies have demonstrated the biological activity of *P. californicum*, such as antiinflamatory, antiproliferative and antibacterial activities, as well as of its chemical composition and antioxidant activity after extraction with different types of solvents (Iloki-Assanga *et al.*, 2015). This makes *P. californicum* an unexplored and potential source of biologically active compounds.

Reactive oxygen species (ROS) are molecules produced by the mitochondria through normal metabolic processes.

*Autor para correspondencia: Milagros Aguilar-Martinez, Dora Valencia
e-mail: milagros.aguilar@unison.mx; dora.valencia@unison.mx
Received: March 7, 2024
Accepted: June 13, 2024
Published: July 4, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2286

The most common oxidative species are, hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (•OH), superoxide radicals (O_2•–), and singlet oxygen ($^1O_2$). Normally, there is an intracellular balance between ROS generation and scavenging, mainly mediated by enzymatic and non-enzymatic systems such as, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, thioredoxin, glutathione, ascorbic acid, and tocopherol (Carocho and Ferreira, 2013; Prasad *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019). Nevertheless, an excess of ROS can be produced by different sources such as, infection, stress, exercise, inflammation, etc., which leads to an imbalance in ROS levels known as oxidative stress (Carocho and Ferreira, 2013).

Reactive oxygen species can damage several cellular structures, such as lipids, proteins, DNA, and membranes, and are responsible for different pathologies like neurodegenerative disease, vascular disease, inflammation, diabetes, and cancer. Chronic oxidative stress can promote oncogenic signaling pathways, inhibit apoptosis, and enhance genomic instability, all of which are hallmarks of cancer. Additionally, ROS can activate pro-inflammatory pathways, creating a favorable microenvironment for tumor growth and metastasis (Sabharwal and Schumacker, 2014). Cancer cells often exhibit increased levels of ROS due to their rapid metabolism and mitochondrial dysfunction, further exacerbating oxidative stress (Sabharwal and Schumacker, 2014; DeBerardinis and Chandel, 2016). To counteract the effects of oxidative stress, antioxidant molecules from different external sources, such as dietary supplements and natural products, have been used (Heim *et al.*, 2002; Babich *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2017).

In this work, we obtained the methanolic and chloroformic extracts of *Phoradendron californicum*, and determined their chemical composition, antioxidant, antiproliferative and antibacterial activities, to better establish its possible therapeutic potential.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection and extracts preparation

Samples of *Phoradendron californicum* attached to *Prosopis sp.* were collected from the area known as "El Arenoso" (N 31°02.18', W 112°02.58'; Lat: 31.038, Lon: -112.049) between the municipalities of Caborca and Altar in the state of Sonora, Mexico.

For extraction, stems were dried at room temperature and grounded, then mixed with methanol or chloroform in a proportion of 1:10 (sample:solvent) for three days. Samples were concentrated in a rotary evaporator and stored at - 20 °C until use.

Phytochemical screening and total phenolic and flavonoids content

Phytochemical screening

The phytochemical screening was determined following standard protocols previously reported (Savithramma *et al.*, 2011). The qualitative assessment of the presence or absence of secondary metabolites was determined based on color change upon reaction (Savithramma *et al.*, 2011; Uddin *et al.*, 2011).

Total phenolic content

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method as previously described by Singleton and Rossy (Singleton and Rossy, 1965), with modifications. Briefly, 10 µL of sample (adjusted to 2.5 mg/mL) were mixed with 60 µL of sodium carbonate 7 % (w/v), 40 µL of Folin reagent (0.2 N) and 90 µL of milliQ water and placed in a 96-well microplate. The plate was incubated in the dark for 1 h, and then the absorbance measured at 750 nm by an ELISA plate reader (Multiskan EX, ThermoLabSystem, Waltham, MA, USA). A standard curve was prepared using different concentrations of gallic acid (0.8 – 0.006 mg/mL), and the results were expressed in terms of mg of gallic acid equivalent per gram of dry extract.

Total flavonoid content

Content of flavonoids was determined by the aluminum chloride method with modifications (Popova *et al.*, 2004). Briefly, 10 µL of extract (adjusted to 2.5 mg/mL) were mixed with 130 µL of methanol and 10 µL of a 5 % (w/v) $AlCl_3$ solution in a 96-well microplate. The plate was incubated for 30 minutes in the dark and read at a wavelength of 412 nm using an ELISA plate reader (Multiskan EX, ThermoLabSystem, Waltham, MA, USA). A standard curve was prepared using different concentrations of quercetin (1 – 0.2 mg/mL), and the results were expressed in terms of mg of quercetin equivalent per gram of dry extract.

Antioxidant activity by DPPH assay

The antioxidant activity of *P. californicum* methanolic and chloroformic extracts was determined by the DPPH assay as previously reported (Usia *et al.*, 2002) with modifications. The samples were prepared in methanol (100 µL) at different concentrations (3.12-400 µg/mL) and mixed with 300 µM of a DPPH solution (100 µL) in a 96-well plate (Costar, Corning, NY, USA), then the plates were incubated in the dark for 30 minutes, and the absorbance measured at 517 nm in an ELISA plate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ascorbic acid (70 µM) was used as antioxidant control. The antioxidant activity or free-radical scavenging activity is reported as percentage of decrease compared to ascorbic acid.

Cell culture

The human cervix (HeLa), human prostate (PC3) adenocarcinoma cell lines, and non-cancerous murine subcutaneous connective tissue (L-929) cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). All cells were cultured in DMEM media supplemented with L-glutamine solution (200 mM), sodium pyruvate solution (100 mM), L-asparagine (98 %), L-arginine monohydrochloride (≥ 98 %), penicillin-streptomycin solution (1000 U/L U per mL) and 5% FBS (D5F) at 37 °C and 5 % of CO_2.

Antiproliferative activity

The antiproliferative activity was determined using the MTT assay (Mosmann, 1983). Initially, 50 µL of cells were seeded

into a 96-well plate ($1x10^4$ cells) (Costar, Corning, NY, USA) and incubated for 24 h at 37 °C and 5 % CO_2. Next, 50 µL of extract samples at different concentrations were added to each well, and plates were incubated for 48 h. During the last 4 h of treatment, 10 µL of an MTT solution (5 mg/mL) were added. The formed formazan crystals were dissolved using 100 µL of acidic isopropyl alcohol, and the absorbance of the plates were measured by an ELISA plate reader (Multiskan EX, ThermoLabSystem, Waltham, MA, USA) at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. DMSO was used as a solvent control.

Antibacterial activity

The antibacterial activity was evaluated following the protocols established by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023). Briefly, the strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* ATCC 14028 and *L. monocytogenes* ATCC 19115 were incubated for 18 h in LB media. Next, the strains were adjusted to the 0.5 McFarland scale ($1x10^8$ UFC/mL) and then diluted 1:20 in LB media. Then, 10 µL of the inoculum were deposited in each well of a 96-well plate containing 100 µL of *P. californicum* extract at different concentrations (800 - 50 µg/mL). The plates were incubated for 24 h at 37 °C and measured by an ELISA plate reader (Multiskan EX, ThermoLabSystem, Waltham, MA, USA) at 620 nm.

Statistical analysis

The results shown were obtained by at least three independent experiments carried out in triplicate. Data was analyzed using GraphPad Prism 7.0 and statistical significance ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$) was determined by two-way ANOVA with Bonferroni's test.

RESULTS

Phytochemical profile and total phenolic and flavonoids content

The biological activities and antioxidant activity of natural extracts could be due to the presence of polyphenolic compounds such as flavonoids. Nevertheless, their presence can depend on the extraction procedure of the sample. Here, we determined the phytochemical profile and quantified the amount of total phenolics and flavonoids present in both *P. californicum* extracts by spectrophotometric techniques. Table 1 shows the phytochemical profile of methanolic and chloroformic extracts, finding that methanolic extract had presence of saponins, quinones, phenolics and free sugars, while the chloroformic extract was only positive to the presence of saponins. Table 2 shows the total phenolic and flavonoid content of both extracts. We observed that the methanolic extract has a higher amount of phenolic compounds (186.45 ± 4.58 mg EAG/g of extract) compared to the chloroformic extract (13.54 ± 1.57 mg EAG/g of extract) ($p < 0.001$). Nevertheless, the flavonoid content of both methanolic and chloroformic extracts is similar (19.92 ± 1.84 mgEQ/g of extract and 25.55 ± 0.73 mgEQ/g of extract, respectively) ($p < 0.05$).

Tabla 1. Perfil fitoquímico de los extractos de *P. californicum.*
Table 1. Phytochemical profile of *P. californicum* extracts.

	***Phoradendron californicum* extract**	
	Methanolic	**Chloroformic**
Terpenes	-	-
Flavonoids	-	-
Saponins	+	+
Quinones	+	-
Phenolics	+	-
Free aminoacids	-	-
Alkaloids	-	-
Free sugars	+	-

+ (presence); - (absence).

Tabla 2. Flavonoides totales, contenido de fenoles y actividad antioxidante (DPPH) del extracto metanólico y clorofórmico de *P. californicum*.
Table 2. Total flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity (DPPH) of *P. californicum* methanolic and chloroformic extracts.

	***Phoradendron californicum* extract**	
	Methanolic	**Chloroformic**
*Total Phenolics	186.45 ± 4.58[a]	13.54 ± 1.57[a]
**Total Flavonoids	19.92 ± 1.84[b]	25.55 ± 0.73[b]
DPPH – IC_{50} (µg/mL)	47.62 ± 2.90[c]	> 400[c]

*Expressed as mg equivalents of gallic acid/g of dry extract (mg EAG/g of extract)
**Expressed as mg equivalents of quercetin/g of dry extract (mg EQ/g of extract)
[a]Value of $p < 0.001$ of significance from the corresponding Total phenolics of methanolic to the Total phenolics of chloroformic extract. [b]Value of $p < 0.05$ of significance from the corresponding Total flavonoids of methanolic to the Total flavonoids of chloroformic extract. [c]Value of $p < 0.001$ of significance from the corresponding IC_{50} of methanolic to the IC_{50} of chloroformic extract.

Antioxidant activity

Antioxidant activity of the methanolic and chloroformic extracts of *P. californicum* was evaluated by the DPPH assay. We can observe that the methanolic extract has potent antioxidant activity with an IC_{50} of 47.62 ± 2.90 µg/mL (Table 2), and higher concentrations of 100 to 400 µg/mL are comparable to the antioxidant activity of ascorbic acid, which is a strong antioxidant compound. In comparison, the chloroformic extract presented a weak antioxidant activity even at the higher concentration of 400 µg/mL, where its antioxidant activity reaches a maximum of ~ 25 % (Figure 1).

Antiproliferative activity against cancer cells

The antiproliferative activity of methanolic and chloroformic extracts of *P. californicum* was evaluated against HeLa and PC3 cancer cell lines, as well as an L929 normal cell line, by an MTT assay (Figure 2). A dose-response effect can be observed, especially for HeLa and PC3 cell lines treated with chloroformic extract. *Phoradendron californicum* chloroformic extract exhibited higher antiproliferative activity against all three tested cell lines in comparison to the methanolic extract. The most susceptible cell line was PC3 (IC_{50}: 167.67 ± 5.08 µg/mL), followed by HeLa (IC_{50}: 215.62 ± 14.70 µg/mL) and L929 (IC_{50}:

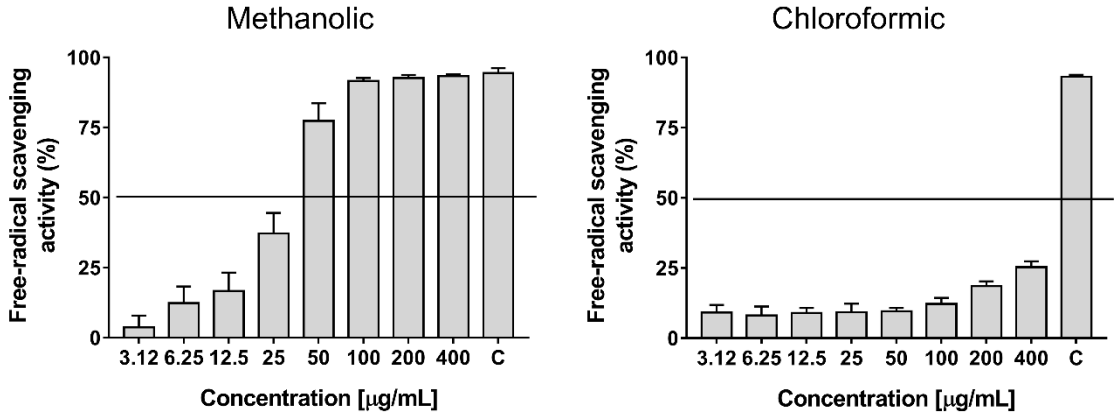


Figura 1. Actividad de eliminación de radicales libres de los extractos metanolico y cloroformico de *P. californicum* determinado por el ensayo de 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). Ácido ascorbico (C) se utilizo como control positivo (70 μM). Los resultados muestran la media de por lo menos tres experimentos independientes ± la desviación estandar.
Figure 1. Free-radical scavenging activity of methanolic and chloroformic extract of *Phoradendron californicum* determined by 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) assay. Ascorbic acid (C) was used as positive control (70 μM). The results shown are the mean of at least three independent experiments ± standard deviation.

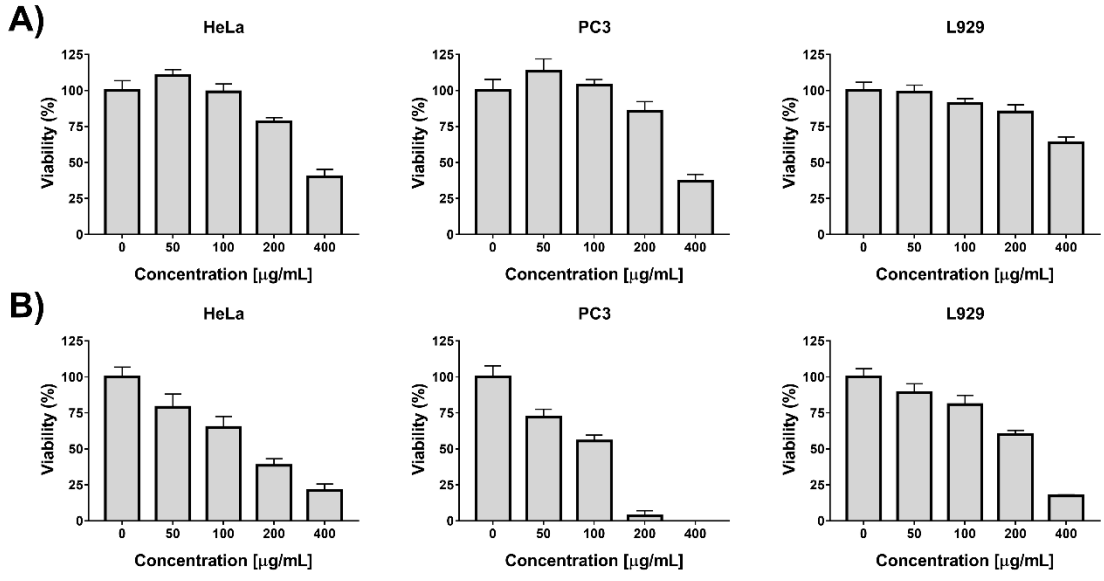


Figura 2. Actividad antiproliferativa de los extractos de *P. californicum* sobre celulas HeLa, PC3 y L929. A) extracto metanolico y B) extracto cloroformico. Los resultados muestras la media de por lo menos tres experimentos independientes ± la desviación estandar.
Figure 2. Antiproliferative activity of *P. californicum* plant extract against HeLa, PC3 and L929 cell lines. **A)** methanolic extract and **B)** chloroformic extract. The results shown are the mean of at least three independent experiments ± standard deviation.

243.68 ± 10.54 μg/mL) ($p < 0.001$). For the methanolic extract, the IC_{50} against PC3 and HeLa were similar (340 ± 11.58 μg/mL and 352.51 ± 9.87 μg/mL, respectively) with no statistical significance between them ($p < 0.05$), meanwhile, for L929 cell line the IC_{50} was higher than 400 μg/mL (Table 3).

Antibacterial activity

The antibacterial activity of methanolic and chloroformic extracts was evaluated against three different bacterial strains; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* (serovar typhimurium) ATCC 14028 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. As observed in Figure 3, the antibacterial activity depends on the strain and type of extract evaluated. *S. enterica* was more susceptible to the methanolic extract compared to the chloroformic extract, on the other hand, *E. coli* was more susceptible to the chloroformic extract compared to methanolic extract. For *L. monocytogenes* the chloroformic extract was more effective at the higher concentration evaluated (800 μg/mL) with a viability of around 60%.

DISCUSSION

Mexico possesses a wide variety of medicinal plants commonly use in traditional medicine to treat different pathologies. Different studies have been carried out demonstrating the antimicrobial, antidiabetic, antioxidant and antiproliferative activities of different Mexican plants (Alonso-Castro

Tabla 3. Actividad antiproliferativa de los extractos metanolico y cloroformico de *P. californicum.*
Table 3. Antiproliferative activity of methanolic and chloroformic extract of *P. californicum.*

Extract	IC_{50} (µg/mL)		
	HeLa	PC-3	L-929
Methanolic	352.51 ± 9.87[a]	340 ± 11.58[a]	> 400[a]
Chloroformic	215.62 ± 14.70[b,c]	167.67 ± 5.08[c]	243.68 ± 10.54[b,c]

IC_{50} values represent the mean of three independent experiments ± standard deviation. [a]Value of $p \leq 0.001$ of significance between the IC_{50} of L929 and the IC_{50} of HeLa and PC3. [b]Value of $p \leq 0.05$ of significance between the IC_{50} of HeLa and L929. [c]Value of $p < 0.001$ of significance between the IC_{50} of HeLa, PC-3 and L-929.

et al., 2011; Jiménez-Estrada *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017; Escandón-Rivera *et al.*, 2020). Here, we evaluated the antioxidant activity, phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents of the methanolic and chloroformic extracts of *P. californicum*, as well as its antiproliferative and antibacterial activity.

The free-radical scavenging capacity of both extracts was determined by a DPPH assay, and it was evident that the methanolic extract exert higher antioxidant activity compared to the chloroformic extract. Although reports on *P. californicum* biological activities are scarce, some studies reporting the antioxidant activity of different extracts have been observed. Jiménez-Estrada *et al.* (2013) reported the antioxidant activity of the methanolic extract of various medicinal plants from northwest Mexico, including *P. californicum*, nevertheless, its antioxidant activity was weaker (approximately, 30% at 100 µg/mL) compared to our results. These differences could be attributed to the extraction process despite using the same type of solvent. On the other hand, Iloki-Assanga *et al*. (2015) observed an IC_{50} of around 50 µg/mL for the methanolic extract of *P. californicum*, very similar to the results obtained in this work. These findings remark the importance of the standardization of the extraction process regarding natural extracts for the suitable comparison of their biological activities.

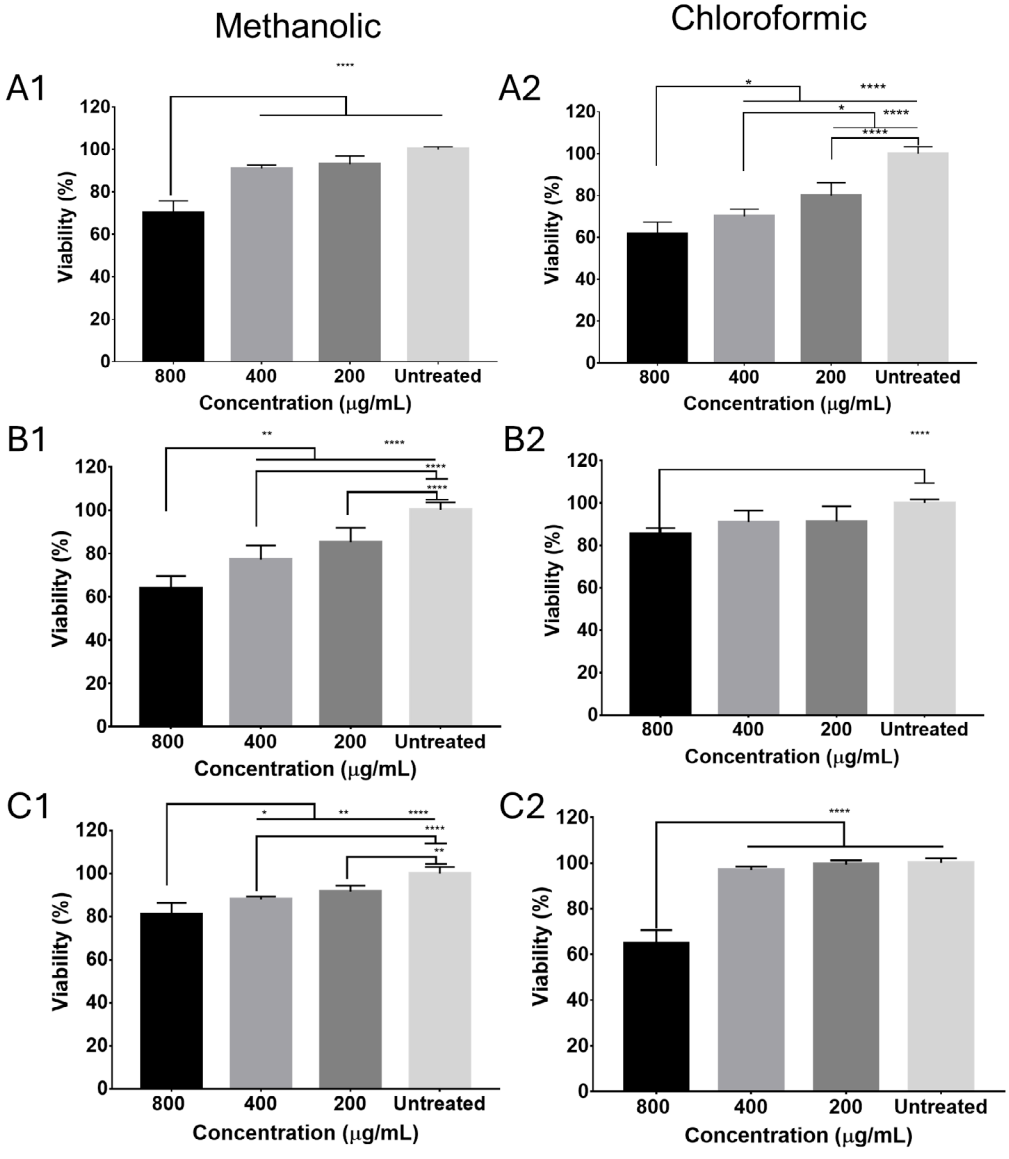


Figura 3. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico y clorofórmico de *P. californicum*. A1-2) *Escherichia coli* ATCC 25922; B1-2) *Salmonella entérica* (serovar typhimurium) ATCC 14028; C1-2) *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Los resultados muestras la media de por lo menos tres experimentos independientes ± la desviación estandar. ******(*p*<0.0001); *** (*p*<0.001); ** (*p*<0.05); *ns.**
Figure 3. Antibacterial activity of methanolic and chloroformic extracts of *P. californicum*. A1-2) *Escherichia coli* ATCC 25922; B1-2) *Salmonella enterica* (serovar typhimurium) ATCC 14028; C1-2) *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. The results shown are the mean of at least three independent experiments ± standard deviation. ******(*p*<0.0001); *** (*p*<0.001); ** (*p*<0.05); *ns.**

Antioxidant activity of plant extracts is usually related to its phenolic and flavonoid content, which are mainly responsible due to their free-radical scavenging potential, and is strongly associated with the type of solvent used for the extraction process. Methanolic extract of *P. californicum* presented a higher content of phenolic compounds (186.45 ± 4.58 mg EAG/g of extract) compared to the chloroformic extract (13.54 ± 1.57 mg EAG/g of extract), which could be the main compounds responsible for the poor antioxidant activity of chloroformic extract. Nevertheless, the total flavonoid content was similar between the two samples. Phenolic compounds and flavonoids exert their antioxidant activity mainly by scavenging reactive oxygen species, by the electron-donating properties of their hydroxy groups, either by hydrogen atom transfer or sequential proton loss electron transfer, by modulating the activity of enzymes responsible for the formation of ROS and chelating elements needed in their synthesis (Pietta, 2000; Zeb, 2020).

There are few reports regarding the antiproliferative activity of *Phoradendron* species extracts. Gil Salido (2016) reported the antiproliferative activity of various Mexican plants extracts, including a methanolic extract of *P. californicum*. They determined an IC_{50} of 103.21 ± 3.01 µg/mL and 178.43 ± 3.32 µg/mL against RAW 264.7 and L929 cell lines, respectively. This activity is lower than the one we observed against HeLa and PC3 cell lines, and even against L929. Our results are more in accordance with the antiproliferative activity reported by Jimenez-Estrada *et al.* (2013), who observed low antiproliferative activity of methanolic extract of *P. californicum* against HeLa, Raw 264.7, L929 and M12.C3.F6 cell lines, with IC_{50} higher than 400 µg/mL.

Regarding the antibacterial activity, in this study the chloroformic extract was more effective against *E. coli* and *L. monocytogenes*, in contrast, the methanolic extract was more active against *S. enterica*. Reports of the antibacterial activity of *Phoradendron* species is very limited. *Phoradendron serotinium* extract has been evaluated against various gastrointestinal pathogens were the minimum inhibitory concentrations values ranged from 6.25 to 12.5 mg/mL (Science Technology and Management, 2023). Meanwhile, other studies have been highly contrasting, were extracts of *P. bollanum* have presented MIC values of 377.1 µg/mL and 5.6 µg/mL against *Xanthomonas campestris* and *Clavibacter michiganensis*, respectively (García-García *et al.*, 2021).

The solvent used for the extraction plays a critical role in the chemical composition of the final product. Chloroform is used for the extraction of non-polar compounds like triterpenes, sterols, alkaloids and fatty acids. Valencia-Chan *et al.* (2022) demonstrated that four triterpenes isolated from *Phoradendron wattii* induce apoptosis and cell cycle arrest on K562 and HL60 leukemia cells. Here, the chloroformic extract of *P. californicum* was negative for terpenes and alkaloids, nevertheless, some constituents like fatty acids and sterols have been reported in different *Phoradendron* species, such as palmitic acid, octadecadienoic acid, octadecenoic acid and stearic acid in *P. mucronatum* and hexadecane, hexacosahexane and nonacosane in *P. mycrophyllum* (Bastos *et al.*, 2017).

It has been demonstrated that secondary metabolite production in plants can vary depending on environmental factors such as climate, seasonality, heat, and drought (Peters *et al.*, 2018; Sun and Fernie, 2023). For parasitic plants such as *P. californicum*, their secondary metabolites can also differ depending on their host. A 2020 study reported that *P. californicum* extracts obtained from oak had more phenolic and antioxidant activity compared to *P. californicum* of palo verde, hence some secondary metabolites correlate to their host, making the possible variation on the chemical composition between samples of *P. californicum* extracts even greater (Assanga *et al.*, 2020).

These results indicate that *Phoradendron californicum* extracts have the potential to reduce the effects caused by free radicals and exert antiproliferative and antibacterial. However, it is necessary to isolate and identify the compounds responsible for these biological activities, and to standardize the obtention and study of natural plant extracts.

CONCLUSIONS

P. californicum methanolic extract exhibited a higher antioxidant activity compared to the chloroformic extract, this correlates to its higher total phenolics content. On the other hand, the chloroformic extract showed a higher antiproliferative and antibacterial activity, which may be due to non-polar compounds present in the plant, which may have a higher bioactivity against cancer cells and bacteria.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F. and Garcia-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133(3), pp. 945–972.

Andrea Gil Salido, A. 2016. Composition of secondary metabolites in mexican plant extracts and their antiproliferative activity towards cancer cell lines. *International Journal of Sciences* 2(03), pp. 63–77.

Assanga, S.B.I. *et al.* 2020. Comparative analysis of phenolic content and antioxidant power between parasitic *Phoradendron californicum* (toji) and their hosts from Sonoran Desert. *Results in Chemistry* 2, p. 100079.

Babich, H., Schuck, A.G., Weisburg, J.H. and Zuckerbraun, H.L. 2011. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology* 2011, pp. 1–12.

Bastos, I.V.G.A. *et al.* 2017. Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *phoradendron mucronatum* and *phoradendron microphyllum* (Viscaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 89(2), pp. 991–1001.

Carocho, M. and Ferreira, I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51, pp. 15–25.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023. m100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd edition,m100ed33. clsi.

DeBerardinis, R.J. and Chandel, N.S. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2(5).

Escandón-Rivera, S.M., Mata, R. and Andrade-Cetto, A. 2020. Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants: A review. *Molecules* 25(18), pp. 1–33.

García-García, J.D. *et al.* 2021. Phytochemical characterization of *Phoradendron bollanum* and *Viscum album* subs. austriacum as mexican mistletoe plants with antimicrobial activity. *Plants* 10(7), p. 1299.

Hawksworth, F.G. and Wiens, D. 1994. *Viscaceae*: Mistletoe Family. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 27(2), pp. 241–246.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10), pp. 572–584.

Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Luján, L.M., Lara-Espinoza, C.L., Gil-Salido, A.A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J.L. and Haines, D.D. 2015. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras L*. and *Phoradendron californicum*. Complementary and Alternative Medicine. *BMC Research Notes* 8(1), pp. 1–14.

Jiménez-Estrada, M. *et al.* 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13.

Kim, E.-K., Jang, M., Song, M.-J., Kim, D., Kim, Y. and Jang, H.H. 2019. Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells. *Antioxidants* 8(10), p. 471.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1–2), pp. 55–63.

Peters, K., Gorzolka, K., Bruelheide, H. and Neumann, S. 2018. Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes. *Ecology and Evolution* 8(17), pp. 9105–9117.

Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7), pp. 1035–1042

Popova, M. *et al.* 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis* 15(4), pp. 235–240.

Prasad, S., Gupta, S.C. and Tyagi, A.K. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters* 387, pp. 95–105.

Sabharwal, S.S. and Schumacker, P.T. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer* 14(11), pp. 709–721.

Savithramma, N., Linga Rao, M. and Suhrulatha, D. 2011. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East Journal of Scientific Research* 8(3), pp. 579–584.

Science Technology, N.J.O. and Management, A. 2023. antibacterial activities and bi-herbal ethanolic leaf extract of mistletoe (*Phorademdron serotinum*) and mango (*Mangifera indica*) against selected gastrointestinal pathogens.

Sharma, A., Flores-Vallejo, R. del C., Cardoso-Taketa, A. and Villarreal, M.L. 2017. Antibacterial activities of medicinal plants used in mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 208, pp. 264–329.

Silva, R.P.D. *et al.* 2017. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE* 12(3), pp. 1–18.

Singleton, V.L. and Rossy, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), pp. 144–158.

Spurrier, S. and Smith, K.G. 2007. Desert mistletoe (*Phoradendron californicum*) infestation correlates with blue palo verde (*Cercidium floridum*) mortality during a severe drought in the Mojave desert. *Journal of Arid Environments* 69(2), pp. 189–197.

Sun, Y. and Fernie, A.R. 2023. Plant secondary metabolism in a fluctuating world: climate change perspectives. *Trends in Plant Science*.

Uddin, G. *et al.* 2011. Phytochemical and biological screening of the seeds of *Indigofera heterantha* Wall. *Middle-East Journal of Scientific Research* 8(1), pp. 186–190.

Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. and Kadota, S. 2002. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products* 65(5), pp. 673–676.

Valencia-Chan, L.S., Moreno-Lorenzana, D., Ceballos-Cruz, J.J., Peraza-Sánchez, S.R., Chávez-González, A. and Moo-Puc, R.E. 2022. Apoptotic and cell cycle effects of triterpenes isolated from *Phoradendron wattii* on leukemia cell lines. *Molecules* 27(17), p. 5616.

Zeb, A. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry* 44(9), pp. 1–22.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Estrategia de manejo de *Brassica oleraceae* L. var Capitata, empleando buenas prácticas agrícolas, Jinotega, Nicaragua

Management strategy for *Brassica oleraceae* L. var Capitata, using good agricultural practices, Jinotega, Nicaragua

Freddy Rivera Umanzor*[1], Juan Carlos Morán Centeno[1]
[1] Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.

ABSTRACT
The objective of the study was to analyze the importance in the implementation of good practices as a management strategy in the cultivation of cabbage at the rural communities of the Jinotega municipality. The study was prospective, cross-sectional, non-experimental, with 10 farms evaluated. To collect the information, the survey was applied. The areas established with cabbage were in the range of 0.5 to 3 hectares, highlighting the use of chemical fertilizers. Monitoring and trapping were carried out to manage pests and diseases. *Plutella xilostella*, *Agrotis* sp., *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp., are the most prevalent, sprinkler irrigation from surface sources is used. There is a direct relationship between the cultivated area, yield and profit. To save the lives of workers, they use personal protective equipment (PPE). To guarantee a safe and quality product, the means of transport are sanitized, and laboratory analyzes are carried out. It is concluded that 30 % of producers implement good agricultural practices to transform their production systems and improve marketing; producers must adapt to the constant changes that markets demand to transform their production systems.
Keywords: Management practices, pests, farmers, cabbage, BPA.

RESUMEN
El objetivo del estudio fue analizar la importancia en la implementación de buenas prácticas como estrategia de manejo en el cultivo de repollo en las comunidades rurales del municipio de Jinotega**.** El estudio fue prospectivo, transversal de tipo no experimental, se evaluaron 10 fincas. Para el levantamiento de la información se aplicó la encuesta. Las áreas establecidas con repollo estuvieron en el rango de 0.5 a 3 hectáreas, destacando el uso de fertilizantes químicos. Se realizaron monitoreos y trampeos para el manejo de las plagas y las enfermedades. *Plutella xilostella*, *Agrotis* sp., *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp., son las de mayor prevalencia, se emplea riego por aspersión, de fuentes superficiales. Existe una relación directa entre el área cultivada, rendimiento y ganancia. Para salvaguardar la vida de los trabajadores hacen uso de equipos de protección personal (EPP). Para garantizar producto inocuo y de calidad los medios de transporte son sanitizados, así mismo, se realizan análisis de laboratorios. Se concluye que el 30 % de los productores implementan buenas prácticas agrícolas para transformar sus sistemas productivos y mejorar la comercialización, los productores deben adaptarse a los constantes cambios que exigen los mercados para transformar sus sistemas de producción.
Palabras clave: Prácticas de manejo, plagas, agricultores, repollo, BPA.

INTRODUCCIÓN
En Nicaragua existen zonas con agroecológicas para el cultivo del repollo. Esta hortaliza se crece en rangos de 15-28 °C y altitudes de 600 – 1500 m sobre el nivel del mar (msnm), los departamentos donde se cultiva el repollo principalmente son: Estelí, Carazo, Masaya, Matagalpa y Jinotega, los dos últimos son los de mayor producción (Díaz Blandón *et al*., 1999). Su constante demanda durante el año y la generación de empleo, lo hace una hortaliza importante en estas regiones. El cultivo está en manos de pequeños y medianos productores con pocos recursos económicos, los que cultivan parcelas bajo el modelo de monocultivo o asociado con promedio de áreas de 0.34 a 3.49 ha (Díaz Blandón *et al*., 1999).

En los últimos diez años, en el municipio de Jinotega se ha trabajado en coordinación con los pequeños productores de hortalizas, en la búsqueda de alternativas que incrementen su producción y con ello mejores ingresos económicos. Como parte de la transformación de producir sano, disminuyen el uso de plaguicidas de síntesis química y se enfocan en las buenas prácticas agrícolas (BPA).

Las BPA se definen como un conjunto de acciones o prácticas que se realizan en una explotación agrícola, tendientes a reducir los peligros químicos, físicos y microbiológicos, orientadas a obtener productos inocuos (sanos-limpios), mejorar las condiciones de los trabajadores (salud y bienestar) y proteger el ambiente, con prácticas de higiene aceptables y económicamente factibles (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2022).

Tomando en cuenta la importancia de este cultivo en la economía local y nacional, este estudio tuvo como objetivo analizar la implementación de BPA como estrategia de manejo agronómico y fitosanitario en el cultivo de repollo en diez fincas rurales del municipio de Jinotega, Nicaragua.

MATERIALES Y MÉTODOS
Características del área de estudio
El estudio se llevó a cabo en la cabecera departamental de Jinotega, específicamente en el municipio de Jinotega ubicado en el norte de Nicaragua (Latitud: 85°46'05", Longitud: 13°80'24"), a 142 km de la capital Managua, se ubica a una

*Autor para correspondencia: Freddy Rivera Umanzor
Correo-e: riverafreddy057@gmail.com; freddy.rivera@ci.una.edu.ni
Recibido: 14 de mayo de 2024
Aceptado: 5 de agosto de 2024
Publicado: 28 de agosto de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2327

altitud de 1004 msnm, su superficie es de 880.3 km, (Instituto Nicaragüense de Estadísticas y Censos (INIDE, 2011). Las fincas seleccionadas se encuentran en la zona costera del lago de Apanas, pertenecientes al municipio de Jinotega, en el departamento de Jinotega, presenta tres zonas climáticas definidas: zona seca: se caracteriza por presentar rangos de 22 a 27 °C, las precipitaciones entre 600 y 1000 mm anuales y altitud de 630 msnm, zona intermedia: las precipitaciones oscilan entre 800 y 1200 mm anual, con rangos de 21 a 24°C y elevaciones de 900 a 1600 msnm, zona húmeda: ubicada a la misma altitud que la zona intermedia con precipitaciones mayores que oscilan entre 800 y 2000 mm anual; rangos de 19 a 22°C, respectivamente.

Diseño metodológico

Este estudio fue prospectivo, descriptivo del tipo no experimental el cual consistió en analizar la implementación de BPA como una estrategia de manejo en el cultivo de repollo haciendo énfasis en el manejo agronómico y fitosanitario. La información analizada se obtuvo a partir de diez encuestas a productores de repollo que han venido implementando BPA (Tabla 1). La muestra total fue definida por conveniencia, así como la identificación de los individuos a entrevistar, se implementó un muestreo con base a la técnica de bola de nieve, considerando los medios disponibles y la selección de los encuestados de acuerdo con aquellos agricultores que formaron parte de la población objetivo a los que se tuvo acceso. Si bien esto reduce la representatividad de la información obtenida respecto a la población bajo estudio - pequeños productores de repollo, se trata de un muestreo adecuado para la realización de un análisis exploratorio de la realidad rural (Etikan *et al*., 2016).

Búsqueda de información

Las encuestas fueron realizadas durante el mes de febrero de 2024. Con anterioridad se llevó a cabo un proceso de coordinación con las autoridades del Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA). La información obtenida fue tratada mediante técnicas de análisis descriptivo, con frecuencias, porcentajes y promedios, en el caso de las preguntas cerradas, lo que permitió visualizar la realidad del campo (Querol *et al*., 2014).

Variables evaluadas

La información obtenida fue analizada para relacionar los diferentes componentes de manejo agronómico y fitosanitario en los diferentes sistemas de producción (área de producción implementando BPA, tipos de fertilización, frecuencia de aplicación, manejo de plagas y enfermedades, sistema de riego, fuentes hídricas), bioseguridad (capacitación y equipos de protección personal) y trazabilidad de la producción (comercialización, medio de transporte, análisis de producto final).

Tabla 1. Ubicación geográfica de las comunidades rurales que cultivan repollo implementado BPA en el municipio de Jinotega.
Table 1. Geographic location of rural communities that grow cabbage implemented BPA at the municipality of Jinotega.

N°	Comunidad	Latitud	Longitud	Área cultivada
1	Chagüite Grande	86°04'59"	13°14'86"	4 ha
2	Tomatoya	86°05'77"	13°14'90"	0.5 ha
3	San Antonio de Sisle	86°03'25"	13°23'37"	2.25 ha
4	El carril	86°053'2".	13°22'34"	3 ha
5	Sasle	86°04'08"	13°20'18"	0.75 ha

Análisis de la información

La información generada mediante la encuesta se procesó mediante el Software Microsoft Excel empleando análisis descriptivo (frecuencia y porcentaje).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componente de manejo agronómico y fitosanitario

Los problemas fitosanitarios que afectan el cultivo de repollo generan el uso continuo de plaguicidas, lo cual no varió como ocurre en el resto de Nicaragua, donde el manejo de plagas se realiza con plaguicidas de síntesis química (Amoabeng *et al*., 2017). El manejo convencional no solo implica un riesgo directo en la salud de los aplicadores de plaguicidas y de los consumidores. También al ambiente; al afectar organismos no objetivos pese a que los agricultores de cierta manera conocen las consecuencias que ocasiona su aplicación (Walker *et al*., 2012).

Se encontró que el 30 % de los encuestados cuenta con un área productiva de 0.5 a 1 hectárea, seguido de un 20 % que cuenta con 1.5 hectárea y que además implementa buenas prácticas agrícolas como una alternativa de manejo de su producción (Figura 1). El 80 % de los productores implementan BPA en su área de siembra, realizan tres aplicaciones de fertilizantes convencionales por ciclo, seguido por la aplicación combinada de productos químicos y biológicos en un 40 % respectivamente (Figura 2).

Desde el punto de vista de la implementación de BPA y con base a los resultados de la encuesta se confirmó que los pequeños productores de repollo aún no se han apropiado de éstas, como estrategias de producción amigables con el ambiente y la salud humana. La agricultura convencional sigue siendo la principal opción para los productores de repollo en dicha zona sin adoptar nuevos cambios en su sistema productivo. Si bien, las bondades que implica implementar

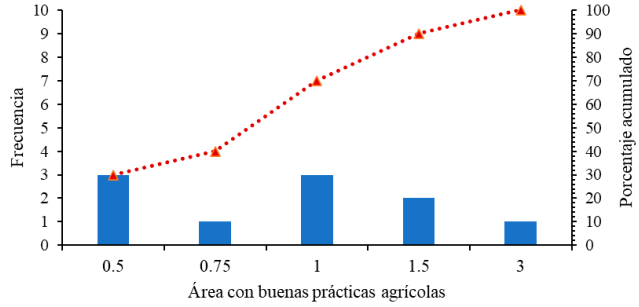


Figura 1. Porcentaje de área para cultivar repollo con implementación de buenas prácticas agrícolas.
Figure 1. Percentage of area to grow cabbage with implementation of Good Agricultural Practices.

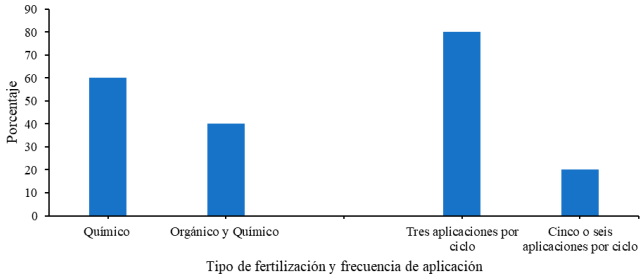


Figura 2. Tipo de fertilización y frecuencia de aplicación en las fincas que están implementado buenas prácticas agrícolas.
Figure 2. Type of fertilization and frequency of application at farms that are implementing good agricultural practices.

este sistema convencional no dejan de ser un problema para el ambiente. La implementación de productos sintéticos es evidente los efectos que causan en el suelo, cuerpos de agua, salud humana y salud animal (Marín Céspedes, 2015).

Los productores de repollo en los últimos diez años han venido buscando nuevos métodos y nuevas técnicas con la perspectiva de mejorar sus rendimientos. Las BPA aportan una buena planificación de las labores en una finca y posibilitan el control de riesgos con el fin de tener productos de calidad (Mesa-Ríos *et al*., 2010).

El control y manejo fitosanitario, sigue siendo dependiente en un 60% de productos químicos sintéticos, no obstante, el 100 % los productores realizan monitoreo y de éstos un 90 % realiza el trampeo de plagas; estas actividades son importante en el manejo de plagas en el cultivo ya que prevé el uso excesivo y no planificado de aplicaciones con productos químicos convencionales.

El cultivo de repollo es susceptible al ataque de plagas y enfermedades en sus etapas fenológicas. Sin embargo, los insectos que causan mayor daño al cultivo son lepidópteros debido a que en estadio adulto son nocturnos y desde los primeros instares larvarios penetran desde que comienza a formarse la cabeza del repollo, esta condición los las hacen difíciles de controlar. Las plagas del orden Lepidóptera en cultivos hortícolas causan daños directos en el producto comercial de tal manera que pueden reducir hasta 99 % del rendimiento de la producción (Maish, 2019**).**

Los resultados obtenidos evidenciaron que las plagas y las enfermedades que causa mayores daños al repollo son:

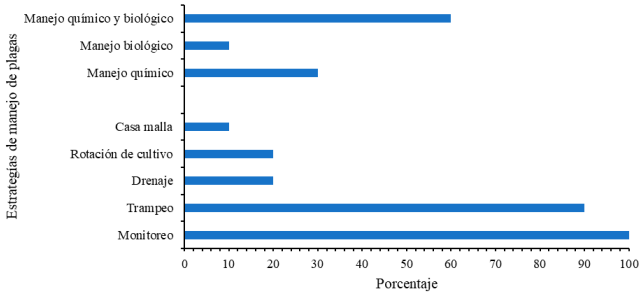


Figura 3. Estrategia de manejo de plagas en las fincas productoras de repollo que implementa BPA.
Figure 3. Pest management strategy in cabbage producing farms that implements BPA.

Plutella xylostella en un 100 % de incidencia, seguido del gusano cuerudo *Agrotis* sp. con un 90 % de incidencia, en cuanto a las enfermedades las que causan mayores pérdidas en la producción son las causadas por: *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp. en un 90 %, respectivamente (Figura 4).

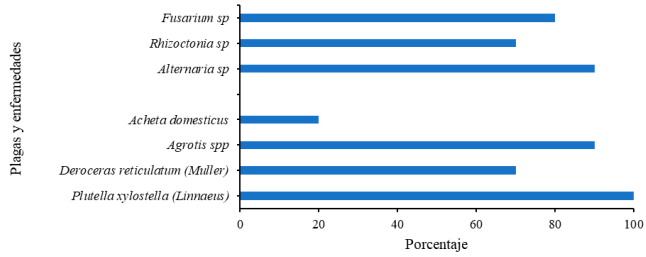


Figura 4. Plagas y enfermedades que afectan a los pequeños productores de repollo de las comunidades rurales de Jinotega.
Figure 4. Pests and diseases that affect small cabbage producers at rural communities of Jinotega.

Los sistemas de riego constituyen una alternativa viable para garantizar la supervivencia y calidad de los cultivos de hortalizas, debido a que presentan ahorro en los costos de mano de obra, mayor cobertura, mejor automatización y control de los niveles de presión del agua. El riego es un elemento importante en estos sistemas de producción. En su mayoría, el cultivo de repollo se establece en época de verano y por ende se hace uso de los sismas de riego para su cultivo, se encontró que un 70 % de los pequeños productores de repollo que implementan BPA hacen uso de riego por aspersión y usan el agua proveniente de la fuente superficiales en un 80 % (Figura 5).

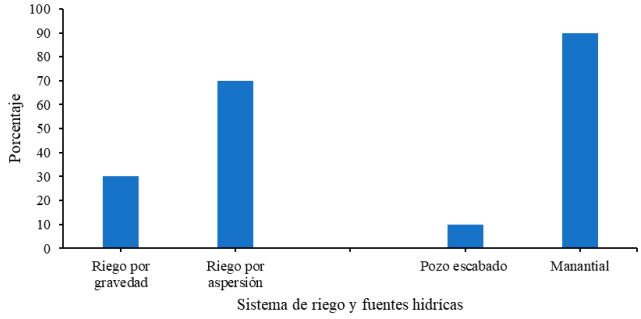


Figura 5. Sistema de riego y fuentes hídricas usadas por lo pequeños productores de repollo de las comunidades rurales de Jinotega.
Figure 5. Irrigation system and water sources used by small cabbage producers at the rural communities of Jinotega.

Es evidente que a mayor cantidad de áreas cultivadas mayor suele ser la producción y sus ingresos económicos (Tabla 2). Implementar nuevas estrategias de producción ha permitido una mejora significante por parte de los productores de repollo, tanto en sus rendimientos como en la apertura de mercados, siendo las BPA el complemento necesario para la mejoría en su economía.

Table 2. Áreas cultivadas de repollo con BPA en las comunidades rurales de Jinotega versus rendimientos/ingresos.
Table 2. Cabbage cultivated areas with BPA at rural communities of Jinotega versus yields/income.

Área (Hectáreas)	Rendimiento (Unidades. ha^{-1})	Ingresos (USD. ha^{-1})
0.5	7000	2867.29
0.75	10000	4096.12
1	20000	8192.24
1.5	20000	8192.24
3	50000	20480.61

Componente de bioseguridad

Los productores fueron capacitados en temáticas como: manejo de plagas y enfermedades, dosificación de plaguicidas, manejo de residuos de plaguicidas, equipos (Figura 6). Estas temáticas se desarrollaron en el marco de cumplir con los lineamientos que establece el IPSA para certificar y avalar la implementación de BPA como una alternativa de manejo en los sistemas de producción. La capacitación como proceso sistemático, se basa en las necesidades actuales y perspectivas de una entidad cualquiera, grupo de individuos o persona, que está orientado hacia un cambio en los conocimientos, habilidades y actitudes del capacitado, que posibilite su desarrollo integral, lo que les permite sentirse preparados ante cualquier cambio y elevar la efectividad de su trabajo en las organizaciones (Arévalo *et al*., 2018).

Los agroquímicos son sustancias que deben manejarse con responsabilidad, el trabajador debe acatar el cumplimiento de leyes, normas y técnicas durante el manejo de los productos, incluyendo el transporte, almacenamiento, aplicación, disposición de envases vacíos, productos no usados y vencidos, así como el uso de elementos de protección personal. De esta forma se asegura la salud del trabajador, la salud del consumidor y el equilibrio en los ecosistemas (Miranda, 2009).

Los plaguicidas son los responsables de un elevado número de casos de intoxicación cuando el producto está clasificado como de toxicidad aguda, mientras que los productos con efectos tóxicos crónicos pueden provocar cáncer

Componente de bioseguridad

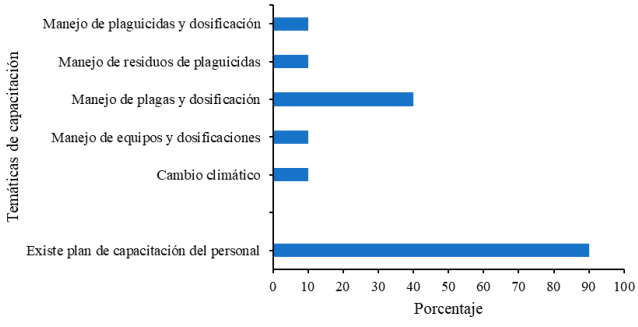


Figura 6. Capacitaciones recibidas por los productores de repollo que implementan BPA en las comunidades rurales de Jinotega.
Figure 6. Training received by cabbage producers who implement BPA at rural communities of Jinotega.

o trastornos hasta en la población no expuesta ocupacionalmente; por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), pretenden reducir los daños causados por los plaguicidas, los cuales representan un riesgo tóxico para la salud y el ambiente (OMS, 2016).

Las medidas de protección es una garantía para los productores desde el punto de vista de resguardar la seguridad y el respeto por la vida y minimizar los riesgos de intoxicación de los trabajadores involucrados. En las actividades de horticultura en el municipio de Jinotega, un 100 % de los productores usan guantes y botas de hule como medida de bioseguridad ante el uso de productos químicos formulados y en un 90 % usan mascarillas con filtro y un 60 % usan capote de protección (Figura7)

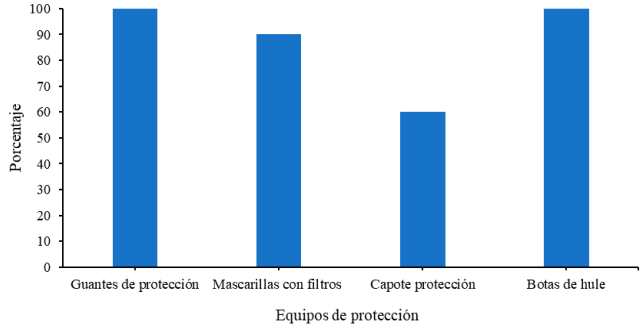


Figura 7. Equipos de protección utilizado por los productores de repollo que implementan BPA en las comunidades rurales de Jinotega.
Figure 7. Protective equipment used by cabbage producers who implement BPA at rural communities of Jinotega.

Componente de trazabilidad de la producción

La importancia de la trazabilidad en la comercialización; es la capacidad para identificar lo que ocurre con un producto, desde las materias primas utilizadas, el proceso de fabricación, el envasado, su embalaje, distribución y hasta el despacho al punto de venta. Por lo tanto, la seguridad alimentaria es una responsabilidad donde los que participan en esta cadena de comercialización del producto deben cuidar para que no existan problemas que afecten a los consumidores y comercializadores de estos alimentos (Ruiz, 2018).

Las exigencias por ofrecer productos de calidad cada día son más rigurosas tanto a nivel externo como a nivel interno de los países y esto pasa por darle un estricto seguimiento a la cadena de distribución de los productos y, sobre todo, productos frescos como el repollo, que es de vida corta de almacenamiento en el mercado por lo que se deben de cumplir con estrictas medidas de higiene en su manipulación (Figura 8). El 100 % de los productores realizan rigurosos procesos de limpieza en sus medios previos a trasladar el producto a los mercados nacionales, utilizan productos desinfectantes como cloro y jabón líquido en la limpieza de camiones y camionetas, dando garantía de calidad e inocuidad del producto en su destino final.

Para confirmar que el producto que se distribuye a los mercados nacionales es de calidad y cumple con las exigencias de dichos mercados, los productores han optado por realizar análisis en los laboratorios oficiales. El 30 % de los

Componente de trazabilidad de la producción

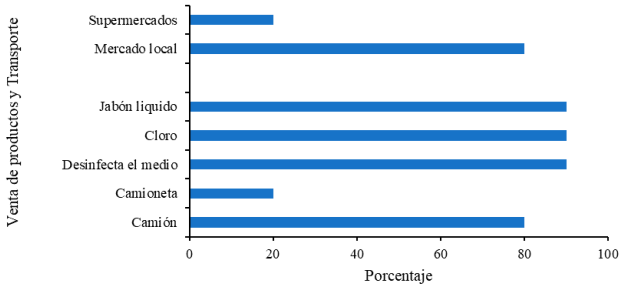


Figura 8. Venta de productos y transporte de repollo a mercados nacionales.
Figure 8. Sale of products and transportation of cabbage to national markets.

productores objeto del estudio realiza análisis multirresiduos y microbiológicos al producto final, lo que garantiza un mejor posicionamiento en el mercado y precio de su producción, por lo que se obtiene ganancias que satisfacen las necesidades básicas del productor (Figura 9). Estudio publicado por Brown (2009), menciona que la eficiencia en los sistemas de producción se relaciona con la rentabilidad y sostenibilidad, en donde el mercado demanda cambios constantes los cuales conllevan a que los productores estén en constantes cambios en sus actividades productivas.

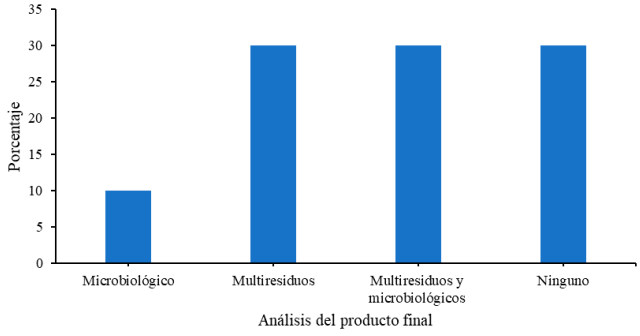


Figura 9. Análisis del producto final de las fincas productoras de repollo implementando BPA en las comunidades rurales de Jinotega.
Figure 9. Analysis of the final product of cabbage producing farms implementing BPA at rural communities of Jinotega.

CONCLUSIONES

El 30 % de los productores de repollo que implementan las buenas prácticas agrícolas lo que les permiten transformar sus sistemas productivos y mejorar la comercialización de sus productos en los mercados nacionales, accediendo a mejores oportunidades de venta y beneficio al final del ciclo productivo.

En Nicaragua, uno de los paradigmas que enfrentan los productores de repollo en términos generales es someterse a los cambios que exigen los mercados nacionales e internacionales, pasar de lo convencional a sistemas tecnificados, para transformar sus sistemas de producción.

AGRADECIMIENTO

A los productores de repollo por brindar información que dieron origen al presente documento

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

REFERENCES

Amoabeng, B., Asare, K., Asare, O., Mochiah, M., Adama, I., Fening, K., & y Gurr, G. (2017). Pesticides use and misuse in cabbage *Brassica oleracea* var. capitata L. (Cruciferae) production in Ghana: The influence of farmer education and training. *Journal of Agriculture and Ecology Research International, 10(1)*, 1-–9. https://doi.org/10.9734/jaeri/2017/30128.

Arévalo, F., Castillo, P., Aguayo, J., Hernández, R., León, A., & y Martínez, C. (2018). Las 5's como herramienta para la mejora continua en las empresas. *Revista Iberoamericana de Ciencias, 5(6)*, 10. 3200888.pdf (reibci.org).

Brown, D.L. (2009). Food Availability and Quality: Situations and Opportunities in developing countries, pp. 405-413. In: D. Wilson, G. Pond, and B.L.L. Brown, Adequate Food for All. CRC Press. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0377-94242015000200105000004&lng=en.

Díaz Blandón, J., Guharay, F., Miranda Ortiz, F., Zamora Solórzano, M., & y Zeledón Zeledón, R. (1999). Manejo integrado de plagas en el cultivo de repollo. https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2977/Manejo_integrado_de_plagas_en_el_cultivo_de_repollo.pdf?sequence=1

Etikan, I., S.A. Musa, S.A., and y R.S. Alkassim R.S. (2016). Comparison of convenience sampling and purposive sampling. *American Journal of Theoretical and Applied Statistics 5:1-4*. doi: 10.11648/j.ajtas.20160501.11. Disponible en Comparison_Convenience_and_Purposive_Sampling-2016_4p-libre.pdf (d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net)

Instituto Nicaragüense de Estadísticas y Censos (INIDE). (2011). Censo Nacional Agropecuario: Informe final. Consultado 12 de feb. 2024. 70 p. Disponible en: http://www.inide.gob.ni/Cenagro/INFIVCENAGRO/informefinal.html#1

Maish, S.C. (2019). Lepidopterous pests, biology and its effect on vegetable crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(4), 593-597. https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue4/PartJ/7-4-65-477.pdf

Marín Céspedes, S. (2015). Comparación de un Andisol manejado convencional y orgánicamente mediante la respuesta de la papa en invernadero a prácticas de fertilización convencional, orgánica y de aplicación de solubilizadores de fósforo [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio Kerwa. https://hdl.handle.net/10669/76801

Mesa-Ríos, A.F., Echeverri Echeverri, C., Correa Montoya, P.A., y Rodríguez Correa, P.A. (2010). Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas en el cultivo de uchuva bajo la norma GLOBAL GAP: producir con la norma BPA es producir con calidad. SENA-ASOHOFRUCOL-CORNARE-UPB- Caribbean Exotics.

Miranda, R. (2009). Uso y manejo de agroquímicos en Sinaloa. Consultado el 12 de septiembre del 2021. Disponible en: http://www.slideshare.net/Sandovalgs05/uso-y-manejo-de-agroquimicosrm.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2022). Alimentación y agricultura sostenibles. Recuperado el 18 de Mayo de 2022, de https://www.fao.org/sustainability/es/.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Plaguicidas altamente peligrosos. Consultados el 03 de febrero del 2021. Disponible en: https://www.who.int/ipcs/assessment/public_ health/pesticides/es/.

Querol, D., Benavides González, A.N., Morán Centeno, J.C., Nieto Reyes, F.H., Schouppenlehner, T., y Yepes Pérez, F. (2014). Cambiando Mentes y Estructuras: Manual del curso diagnóstico Participativo Integral Rural. (1a ed.). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

Ruiz C. I. (2018). Trazabilidad y seguridad alimentaria. IC Editorial. 2da edición. https://www.imosver.com/es/libro/trazabilidad-y-seguridadalimentaria_A000061549

Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S., & y Peakall, D. (2012). Principles of Ecotoxicology ecotoxicology (4ta). CRC Press.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Effect of the concentration and ionic form of nitrogen (N) on photosynthesis, growth and fruit production of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)

Efecto de la concentración y forma iónica del nitrógeno (N) en la fotosíntesis, crecimiento y producción de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Raúl Cárdenas-Navarro[1], Jesús Alonso Luna-Béjar[2], Vilma del Carmen Castellanos-Morales[1], Nayda Luz Bravo-Hernandez[1] and Luis López-Pérez[1]

[1] Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr. Morelia Zinapécuaro, 58880 Tarímbaro, Michoacán, México.

[2] Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, 60170 Uruapan, Michoacán, México.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the main effects and the interactions of nitrogen (N) concentration and ammonium (NH_4^+): nitrate (NO_3^-) proportion in the nutrient solution, on net photosynthesis, plant growth, production and quality of fruits on blueberry (*Vaccinium corimbosum* L.) plants. The studied factors were N concentration (0.6 and 6.0 mM) and NH_4^+: NO_3^- proportion (100 % NH_4^+, 50 % NH_4^+ - 50 % NO_3^- and 100 % NO_3^-). 243 d after the experiment was established, net photosynthesis (PN) was measured and a day after, leaf area (LA), shoots fresh weight (SFW) and roots fresh weight (RFW) were determined. Fruit yield (FY), fruit diameter (FD) and Brix degrees (ºBrix) were evaluated in four harvests along fruit production period. The results showed higher values on PN, LA, SFW, FY and FD in plants that received 6.0 mM N as NH_4^+; nevertheless, N concentration altered the NH_4^+: NO_3^- proportion effects and at 0.6 mM N only FY and FD maintained such a pattern. It is concluded that N concentration modifies the effect of NH_4^+: NO_3^- proportion and it is proposed that the effects of both factors on photosynthesis, growth and fruit production of blueberry were mediated by their interaction with plant carbohydrates availability.

Keywords: nitrate; ammonium; quality; yield; carbohydrates.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la concentración de nitrógeno (N) (0.6 y 6.0 mM), la proporción de amonio (NH_4^+): nitrato (NO_3^-) (100 % NH_4^+, 50 % NH_4^+ - 50 % NO_3^- y 100 % NO_3^-) y su interacción, sobre la fotosíntesis neta, el crecimiento de las plantas, la producción y la calidad de los frutos, en arándano (*Vaccinium corimbosum* L.). Las plantas se mantuvieron por 243 d en un sistema hidropónico y después se midió la fotosíntesis neta (FN), el área foliar (AF), el peso fresco de los brotes (PFB) y el peso fresco de las raíces (PFR). También se evaluó, el rendimiento (RF), diámetro de fruto (DF) y grados Brix (ºBrix). Se encotraron los mayores valores en FN, AF, PSB, RF y DF, en las plantas que recibieron 6.0 mM como NH_4^+; sin embargo, la concentración de N alteró los efectos de la proporción NH_4^+:NO_3^- y a 0.6 mM N, solo RF y DF mantuvieron la tendencia inicial registrada. La concentración de N modifica el efecto de la proporción NH_4^+:NO_3^- y se propone que los efectos de ambos factores sobre la fotosíntesis, el crecimiento y la producción de frutos del arándano estuvieron mediados por su interacción por la disponibilidad de carbohidratos de la planta.

Palabras clave: nitrato; amonio, calidad; rendimiento; carbohidratos.

INTRODUCTION

Nitrogen (N) is considered the most important mineral nutrient for plants, it is found in a higher proportion than other essential elements (1 % to 3 % dry matter), depending on the plant species, phenological stage, and the organ. It is part of fundamental molecules for growth and development such as nucleic acids, amino acids, proteins, chlorophylls and alkaloids (Marschner, 2011). Plants have developed physiological mechanisms to uptake mineral N from the soil, mainly in the forms of nitrate (NO_3^-) or ammonium (NH_4^+) (Errebhi and Wilcox, 1990; Cárdenas-Navarro *et al*., 2006; Lobit *et al*., 2007). The N absorbed as NO_3^- is reduced to NH_4^+ by the enzymes nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR). When this process takes place in the leaves, as in most plants, it depends on reductant compounds generated by photosynthesis, and when it takes place in the roots, the reductants compounds are provided by respiration (Scheurwater *et al*., 2002; Li *et al*., 2013). The NH_4^+ absorbed, or previously produced by the reduction of NO_3^- is assimilated directly into amino acids by the enzyme glutamine synthetase (GS) and requires C compounds to get C skeletons and energy, which can come from previously stored carbohydrates or directly from photosynthesis (Li *et al*., 2013; Doyle *et al*., 2021). On the one hand, N deficiency directly and negatively affects photosynthesis reducing stomatal conductance, content of light harvesting proteins and content and/or activity of photosynthetic enzymes (Mu and Chen, 2021) and indirectly, due to photoassimilates accumulation, through a feedback down-regulation mechanism (Araya *et al*., 2010). On the other hand, N assimilation consumes carbohydrates originally produced

*Author for correspondence: Luis López Pérez
e-mail: luis.lopez.perez@umich.mx
Received: May 20, 2024
Accepted: September 7, 2024
Published: October 8, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2325

by photosynthesis and competes with other physiological processes associated with plant growth and development for these compounds (Li *et al*., 2013).

Plants preferences for NH_4^+ or NO_3^- depend on the species, phenological stage, habitat of species origin and conditions of roots environment such as pH, aeration, temperature (Li *et al*., 2013). *V. corymbosum* L. is native from the temperate forests of North America and grows in the undergrowth, where low temperatures limit the mineralization of the plenty organic matter; in soils with low salinity, acidic pH, abundant organic forms of N, as amino acids and proteins and scarce mineral N, which is mainly found as NH_4^+ (Korcak, 1989; Rosen *et al*., 1990; Metcalfe *et al*., 2011). Therefore, this plant species has evolutionarily adapted to grow in soils with low N availability (Banados *et al*., 2012; Vargas and Bryla, 2015) and to prefer NH_4^+ instead NO_3^-, which allows it to conserve energy, which is an advantage in a low-temperature environment, since the processes of absorption and assimilation of NH_4^+:NO_3^- require less energy than those of NO_3^-; in addition, the assimilation of NO_3^- is restricted by the low content of NR in its leaves and roots (Poonnachit and Darnell, 2004; Osorio *et al*., 2020; Doyle *et al*., 2021; Leal-Ayala *et al*., 2021). Indeed, it has been documented that when N is supplied as NH_4^+, blueberry plants show greater net photosynthesis, leaf area, biomass and content of chlorophyll and mineral nutrients, than when N is provided only as NO_3^- (Osorio *et al*., 2020; Leal-Ayala *et al*., 2021; Yuan-Yuan *et al*., 2021). However, it is unknown if these effects are kept when N availability in the root medium is variable and if there is interaction between the concentration and the ionic form of this element. Therefore, the aim of this work was to study the main effects and the interaction of N concentration and NH_4^+:NO_3^- proportion in the nutrient solution, on net photosynthesis, plant growth, fruit production and quality of blueberry plants var. Biloxi grown in hydroponics.

MATERIAL AND METHODS

Establishment and experimental conditions

An experiment was developed using 96 blueberry plants (*V. corymbosum* L.) var. Biloxi, produced in vitro and hardened in a greenhouse. The 0.3 m high plants with root ball were transplanted in 7.0 L plastic pots containing a substrate composed with a mixture of volcanic gravel "tezontle" (0.005 - 0.007 m diameter) and river sand at 1:2 (v/v) ratio, which was previously disinfected with a 10 % sodium hypochlorite solution. The pots were established in a tunnel-type greenhouse covered with plastic (30 % shading, 7 mil) and located at the Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Morelia, Michoacán, México (Lat. 19°46'11.3 "N, Long. 101°09'00.1 "O; 1860 m.s.n.m.). During the experiment, the average daily temperature inside the greenhouse was 27 °C and the average daily relative humidity was 47 %.

Experimental management

Throughout the first 22 d after transfer to the greenhouse, all plants received 0.3 L of demineralized water every 12 h (at 8:30 a.m. and 8:30 p.m.), using an automated drip irrigation system. In order to homogenize the plant material, three days after transfer to the greenhouse, thinning was carried out to leave a single stem per plant. Seven days later, the apical part of the stem was cut, leaving ten viable buds, and seven days later the buds and shoots were removed, leaving only one shoot per plant, which was supported with plastic stakes during its growth.

Experimental design

The experiment was bi-factorial and the studied factors were the N concentration and the NH_4^+:NO_3^- proportion in the irrigation solution. The first factor had two levels: 0.6 mM and 6.0 mM, and the second factor had three levels: 100 % NH_4^+, 50 % NH_4^+ : 50 % NO_3^- and 100 % NO_3^-. The combination of these factors produced six treatments, repeated four times resulting in 24 experimental units (EU), which were integrated with four plants each and randomly distributed. The treatments application began on day 22 after plant transfer to the greenhouse. Six irrigation solutions (one per treatment) were prepared based on nutrient solution proposed by Cárdenas-Navarro *et al.* (1998). All solutions were prepared with demineralized water (pH 5.0, electrical conductivity 1.80 dSm^{-1}, $H_2PO_4^-$ concentration 1 Eq m^{-3} and anions and cations balance 16 Eq m^{-3}). In order to maintain this balance, NO_3^- concentrations variations were compensated by varying SO_4^{2-} concentrations, and NH_4^+ concentrations changes were balanced by varying the concentrations of K^+, Ca^{++} and Mg^{++}, always keeping the proportion 25 %, 50 %, 25 %, respectively. Microelements concentrations were as follows: H_3BO_3, 42.0 µM; $CuSO_4.5H_2O$, 1.0 µM; Fe-EDTA, 15.0 µM; $MnSO_4.H_2O$, 23.0 µM; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, 0.3 µM and, 6.0 µM.

Variables evaluated

At fruit production phase, 242 d after treatments application (DAT), net photosynthesis (PN) was measured by EU, using a portable photosynthesis system (Li -6400; LI-COR). The measurement was carried out inside the greenhouse between 7:00 - 9:00 am, on a fully expanded mature leaf randomly selected, keeping 1,000 µmol $m^{-2}s^{-1}$ light intensity, 400 µmol mol^{-1} CO_2 concentration and 25 ºC temperature. A day after, 243 DAT, one plant per EU was taken and organs dissected, to determine: leaf area (LA) with a digital planimeter (LICOR, LI-3100C) and with a precision balance (Mettler Toledo, PR8002) shoots fresh weight (SFW) and roots fresh weight (RFW). The fruit yield (FY) was evaluated on one randomly selected plant (from the beginning of the experiment) per EU and four harvests were make (every 15 d) along the production phase. The fruits of each plant were weighed (Mettler Toledo, PR8002), its equatorial diameter was measured with a digital vernier (Truper, 14388) and, in a representative sample, the total soluble solids content (°Brix) was determined with a digital refractometer (HI, 96801).

Statistical analysis

The data were subjected to a two-ways analysis of variance (ANOVA) and when significant statistical differences were

found, the Tukey mean test ($P \leq 0.05$) was applied, using SAS® OnDemand for Academics for Macintosh.

RESULTS

The obtained results on PN showed statistically significant effects of N concentration, NH_4^+:NO_3^- proportion and interaction of both factors (Table 1). The main effects observed is that plants irrigated with 0.6 mM N and those that received this element only as NO_3^- showed lower rate of net CO_2 assimilation (Fig. 1A, 1B). However, when examining factors interaction, it's clear that the effect of the NH_4^+:NO_3^- proportion is different in the two N concentrations studied. The PN drop observed with the increase of NO_3^- proportion in the irrigation solution was only showed by plants that received 6.0 mM of N, while in plants irrigated with 0.6 mM of N non statistically significant differences were detected between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments (Fig. 1C).

The plant biomass production analysis revealed that the variables representing the aerial part growth of plant (the LA and the SFW), showed a similar response that PN. In both variables the effects of the studied factors and their interaction were statistically significant (Table 1), thus, the plants irrigated with 0.6 mM N and those receiving only NO_3^- showed the lowest values (Fig. 2A, 2B, 3A, 3B). Nevertheless, the reduction of LA and SFW observed in plants receiving just NO_3^- in the nutrient solution was only perceived in plants irrigated with 6.0 mM N, whereas non statistically significant differences were detected between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments when plants were irrigated with 0.6 mM N (Fig. 2C, 3C). On the other hand, the RFW did not showed statistically significant effects associated with the studied factors or its interaction (Table 1, Fig. 4A, 4B, 4C).

When examining fruits production and quality it was observed that FY showed statistically significant effects associated to N concentration, to NH_4^+:NO_3^- proportion and to interaction of both factors (Table 1). The main effects analysis revealed that FY was higher in plants that received solutions with 6.0 mM N (Fig. 5A) and decreased as the proportion of NO_3^- in the irrigation solution increased (Fig. 5B). However, the factors interaction analysis showed that the effect of

Table 1. P values from bi-factorial ANOVA analysis of: net photosynthesis (PN), leaf area (LA), shoots fresh weight (SFW), roots fresh weight (RFW), fruit yield (FY), fruit diameter (FD) and degrees brix (ºBrix). The factors were N concentration in irrigation solution ([N]) (0.6 mM and 6.0 mM), and NH_4^+:NO_3^- proportion in irrigation solution (NH_4^+:NO_3^-) (100 %:0 %, 50 %:50 %, 0 %:100 %); [N] * NH_4^+:NO_3^- indicates the interaction of both factors.

Tabla 1. Valores de P del análisis bifactorial ANOVA de: fotosíntesis neta (FN), área foliar (AF), peso fresco de tallo (PFT), peso fresco de raíz (PFR), producción de frutos (PF), diámetro de fruto (DF) y grados Brix (ºBrix). Los factores fueron concentración de N en la solución de riego ([N]) (0.6 mM and 6.0 mM) y la proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego (NH_4^+:NO_3^-) (100 %:0 %, 50 %:50 %, 0 %:100 %), [N] * NH_4^+:NO_3^- indica la interacción entre factores.

Factor	PN	LA	SFW	RFW	FY	FD	°BRIX
[N]	0.018	0.002	0.009	0.660	<0.0001	0.064	0.189
NH_4^+ : NO_3^-	0.001	0.001	0.000	0.356	<0.0001	<0.0001	0.132
[N] * NH_4^+ : NO_3^-	0.054	0.018	0.035	0.356	0.004	0.320	0.623

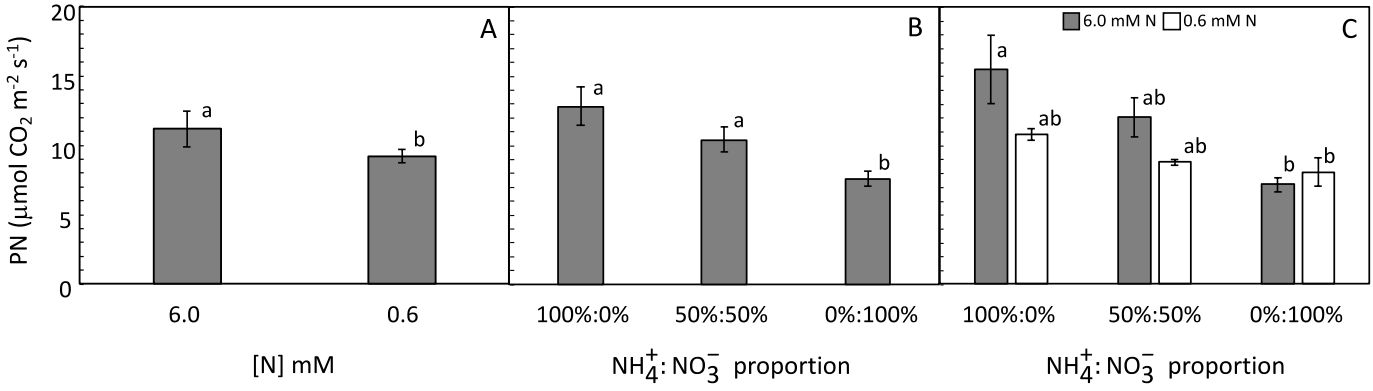


Figure 1. Effect of N concentration in irrigation solution (A); NH_4^+:NO_3^- proportion in irrigation solution (B) and interaction of both factors (C), grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration on net photosynthesis (PN). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at $P \leq 0.05$.

Figura 1. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en la fotosíntesis neta (FN). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

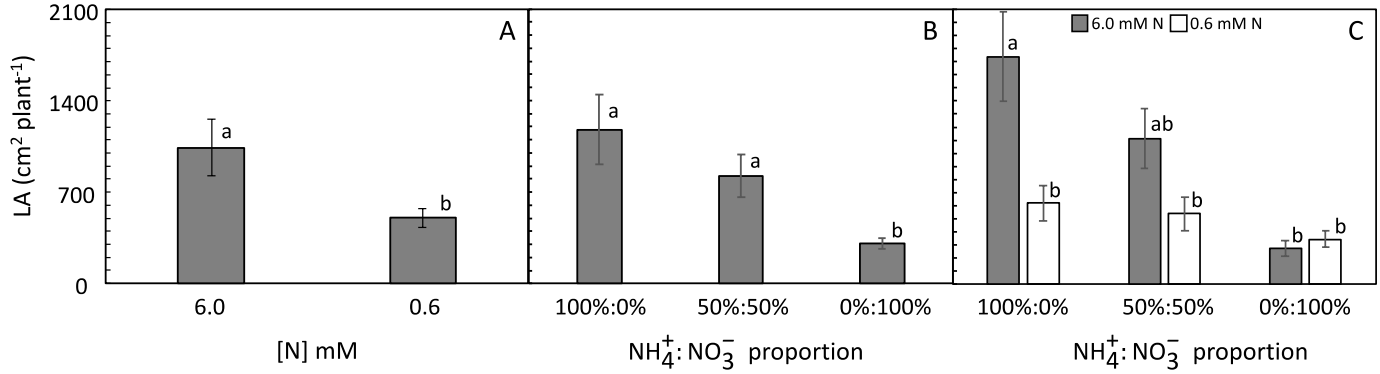


Figure 2. Effect of N concentration in irrigation solution, (A); NH_4^+:NO_3^- proportion in irrigation solution, (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on leaf area (LA). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at P ≤ 0.05.

Figura 2. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en el área foliar (AF). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

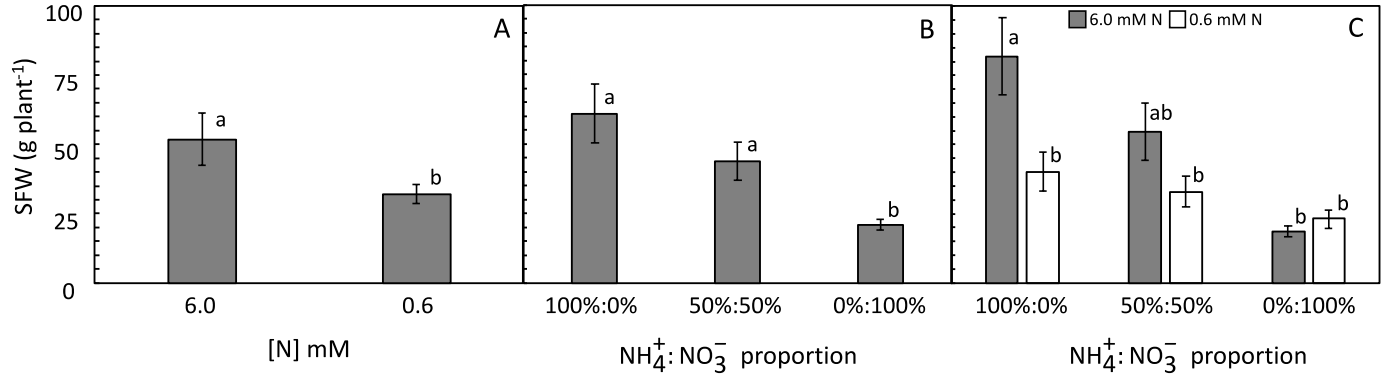


Figure 3. Effect of N concentration in irrigation solution, (A); NH_4^+:NO_3^- proportion in irrigation solution, (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on shoots fresh weight (SFW). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at *P* ≤ 0.05.

Figura 3. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en el peso fresco de tallos (PFT). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

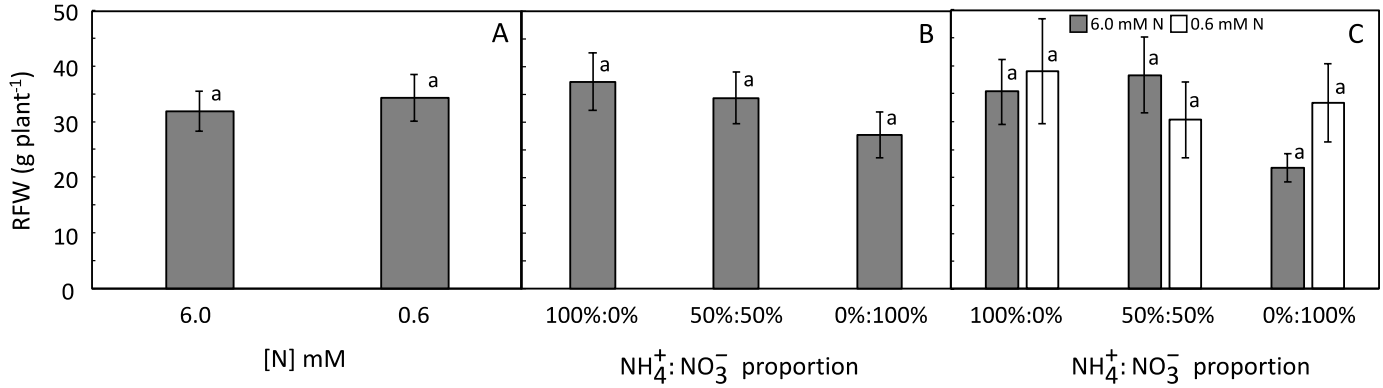


Figure 4. Effect of N concentration in irrigation solution (A); NH_4^+:NO_3^-proportion in irrigation solution (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on roots fresh weight (RFW). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at P ≤ 0.05.

Figura 4. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en el peso fresco de raíces (PFR). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

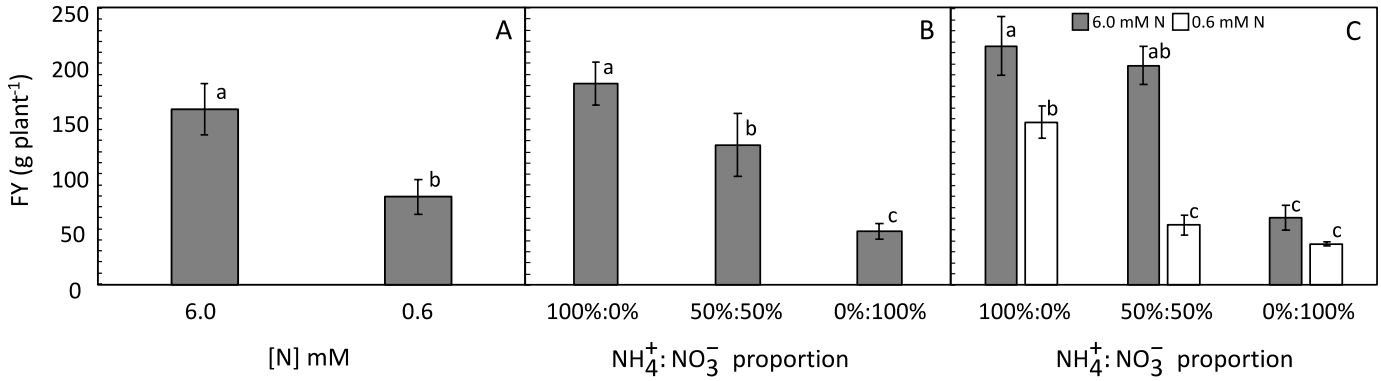


Figure 5. Effect of N concentration in irrigation solution (A); NH_4^+:NO_3^-proportion in irrigation solution (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on fruit yield (FY). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at P ≤ 0.05.

Figura 5. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en la producción de frutos (PF). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

NH_4^+:NO_3^- proportion is different in the two studied concentrations of this element. The plants that received 6.0 mM N had lower FY when this element was provided only in the form of NO_3^-, while in the plants that received 0.6 mM of N, the lower fruits production was observed in treatments with 100 % and also 50 % NO_3^- (Fig. 5C). The FD only showed significant effects associated to NH_4^+:NO_3^- proportion, but not to N concentration or to interaction of both factors (Table 1). The main effects analysis reveals that plants that received only NO_3^- produced the smallest diameter fruits (Fig. 6B) and as the interaction of the studied factors was not significant, this pattern was replicated in both studied N concentrations (Fig. 6C). The ºBrix of fruits did not shows statistically significant effects associated with N concentration, NH_4^+:NO_3^- proportion, or the interaction of both factors (Table 1, Fig. 7A, 7B, 7C).

DISCUSSION

Blueberry is considered a plant with low nutritional requirements, particularly N (Banados *et al*., 2012; Vargas and Bryla, 2015), however, in this work plants that received 0.6 mM N in the irrigation solution showed a lower PN (Fig. 1A). The photosynthesis drop in N-deficient plants is produced by a reduced stomatal conductance, a low availability of energy molecules and light harvesting proteins, as well as reduced content and/or low activity of enzymes involved in carboxylation process (Mu and Chen, 2021). Low photosynthesis in N-deficient blueberry plant is also associated with feedback downregulation mechanism generated by leaf carbohydrates accumulation (Araya *et al*., 2010; Jorquera-Fontena *et al*., 2018). In addition to display a decline in PN, plants that received 0.6 mM N also exhibited less development of the plant aerial part, specifically LA and SFW (Figs. 1A, 2A); therefore, it is evident that

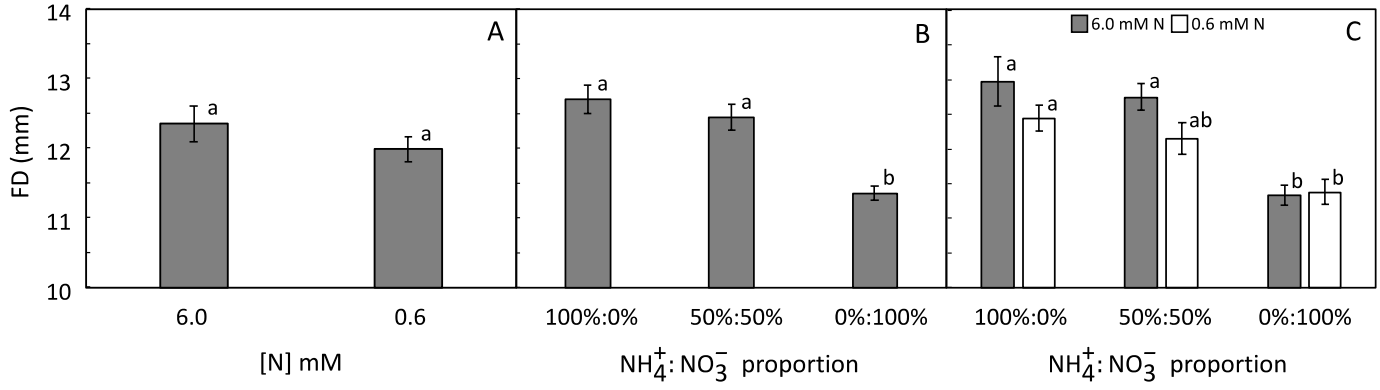


Figure 6. Effect of N concentration in irrigation solution (A); NH_4^+:NO_3^-proportion in irrigation solution (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on fruit diameter (FD). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at P ≤ 0.05.

Figura 6. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en el diámetro del fruto (D). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

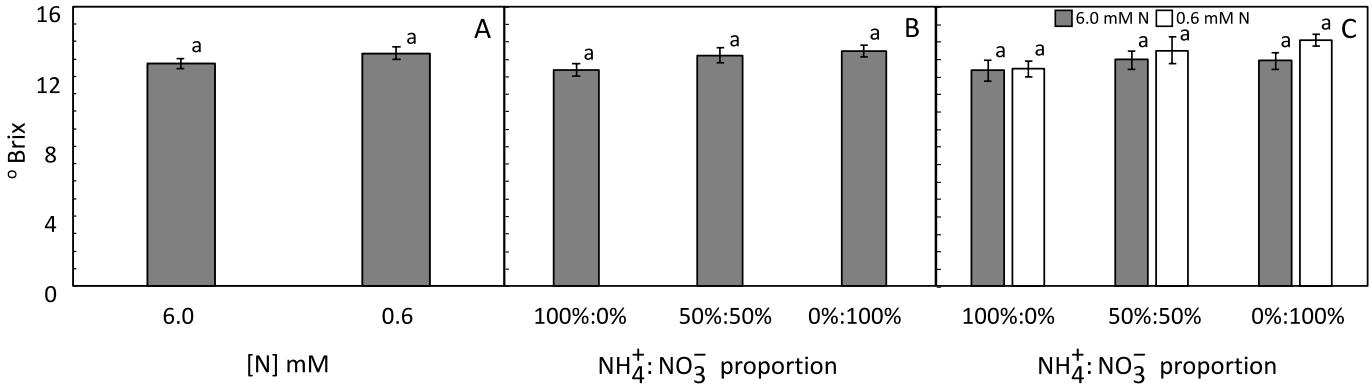


Figure 7. Effect of N concentration in irrigation solution(A); NH_4^+:NO_3^-proportion in irrigation solution (B) and interaction of both factors, grey bars 6.0 mM N concentration and white bars 0.6 mM N concentration (C) on degrees brix (ºBrix). Values are the mean ± standard error; different letters in the bars indicate statistically significant differences according with Tukey test at P ≤ 0.05.

Figura 7. (A). Efecto de la concentracion de N en la solución de riego; (B), proporción de NH_4^+:NO_3^- en la solución de riego y (C), interacción de factores, barras grises concentración de N a 6.0 mM y barras blancas concentration de N a 0.6 mM en los grados Brix (ºBrix). Los valores representan la media ± el error estandar; diferentes letras en las barras indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de Tukey a una P ≤ 0.05.

such a N concentration in the irrigation solution generates a deficiency of this element, which is insufficient to meet the N demand created by plant growth. Moreover, plants that received solutions with 6.0 mM N, together with higher PN, LA and SFW, also showed higher FY (Fig. 5A, 6A, 7A). In most crops, growth and fruit yield rise with the increase of N rate until to a critical level beyond which more N supply increases do not generate augmentations in these variables and may even decline (Cárdenas-Navarro *et al*., 2004). In blueberry several works, carried out under different agronomic conditions, have reported N rates, varying between 34 and 93 kg of N $ha^{-1}year^{-1}$, beyond which increases in plant growth and/or fruit yield were not observed (Bryla and Machado, 2011; Banados *et al*., 2012; Ehret *et al*., 2014; Vargas and Bryla, 2015; Messiga *et al*., 2018). In accordance with these reports, the 6.0 mM N treatments of this work were equivalent to 18.4 g $plant^{-1}year^{-1}$, meaning 51 Kg N $ha^{-1}year^{-1}$ if a common planting density of 2,777 plants ha^{-1} is considered (Banados *et al*., 2012; Vargas and Bryla, 2015). Some reports in the literature indicate that in blueberry N supply reduce the fruits size and affect its sugars accumulation (Ehret *et al*., 2014; Vargas and Bryla, 2015; Zhang *et al*., 2023); however, in this work N treatments did not generate statistical differences neither in FD (Fig. 6A) nor in ºB (Fig. 7A).

Plants uptake mineral N from the soil mainly as NH_4^+ or NO_3^-, the preference between these two ionic forms of N depends on plant species, its origin habitat, its phenological stage and the roots environmental conditions such as pH, temperature, aeration and microbial activity (Li *et al*., 2013). In the literature, most authors claim that blueberry develops better when N is provided only or mainly as NH_4^+ (Doyle *et al*., 2021). In this work, such a preference is confirmed according to the responses registered in the evaluated variables. Firstly, plants that received nutrient solutions in the presence of NH_4^+ showed higher PN (Fig. 1B), compared to those that received only NO_3^-, which agrees with previously published reports on this crop (Osorio *et al*., 2020; Yuan-Yuan *et al*., 2021). Secondly, as is well known, photosynthesis is the main physiological process associated to biomass accumulation and crops production; in this work, plants that received nutrient solutions with NH_4^+, in addition to display higher PN also produced a higher aerial biomass: LA and SFW (Fig. 2B). These results are in accordance with a wide number of previously published reports on blueberry, in which plants biomass increase when supplied with NH_4^+, alone or predominantly, and decrease when received only NO_3^- (Osorio *et al*., 2020; Doyle *et al*., 2021; Yuan-Yuan *et al*., 2021). This behavior is surely associated with *V. corymbosum* L. adaptation to its origin habitat, which is the temperate forests undergrowth and soils with acidic pH, low temperatures, low microbial activity, slow process of organic matter mineralization and NH_4^+ as the predominant inorganic form of N (Korcak, 1989; Metcalfe *et al*., 2011).

The blueberry plant NH_4^+ preference reflects its adaptation to such environmental conditions and is expressed in physiological process as absorption, translocation from the root to the aerial part and assimilation in organic N (Doyle *et al*., 2021). Thirdly, NH_4^+:NO_3^- proportion effects on PN, LA and SFW were likewise observed on the production and quality of fruits. The FY of plants that received only NH_4^+ was threefold than those received only NO_3^- (Fig. 5B), these plants also showed bigger FD (Fig. 6B), although non-statistical differences were observed in ºBrix (Fig. 7B), which agrees with previous reports (Bolaños-Alcántara *et al*., 2019). The increases of FY and FD are surely associated with the higher availability of photo-assimilates, as a result of PN increase; the greater development of LA and the higher number of flower buds and consequently of fruits, as outcome of SFW increase of plants that received NH_4^+ in the irrigation solution.

However, the analysis of studied factors interaction showed that the effect of NH_4^+:NO_3^- proportion on PN, LA, SFW and FY depends on N availability in roots environment. PN of plants that received irrigation solutions with 6.0 mM N was more than twice higher when this element was supplied

as NH_4^+, than when it was provided as NO_3^-. In plants that received 0.6 mM N, no statistical differences were observed between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments (Fig. 1C). It is well established that N is essential in plants photosynthesis and that when its availability in the root milieu is limited, as is the case of plants that received 0.6 mM N in this work, CO_2 fixation decrease, regardless of the ionic form of N supplied in the irrigation solution. In such a condition, as it has been previously reported by several authors in blueberries, photosynthesis decline, either due to the lack of essential compounds that participate both in the transformation of light energy into energetic molecules and in the carboxylation process, or by the feedback downregulation mechanism exerted by the excessive accumulation of carbohydrates (Araya *et al*., 2010; Jorquera-Fontena *et al*., 2018; Petridis *et al*., 2020; Leal-Ayala *et al*., 2021; Mu and Chen, 2021). On the other hand, when plant growth is not limited by the N availability in the root medium, as in the case of 6.0 mM N treatments, the development of the photosynthetic process is not obstructed by the lack of N compounds nor downregulated by carbohydrates accumulation in leaves cells. In such conditions, PN showed by plants that received only NH_4^+ was more than two folds greater than by those supplied only with NO_3^- (Fig. 1C), which could be associated to carbohydrates consumption by NH_4^+ assimilation processes (Li *et al*., 2013), stimulating CO_2 fixation, according to the sugar-sensing mechanism previously proposed in blueberry (Jorquera-Fontena *et al*., 2018; Petridis *et al*., 2020).

The pattern observed on PN, was similar to plant aerial biomass production both in LA and in SFW. In these variables, plants irrigated with solutions at 6.0 mM N showed six- and five-times greater values, respectively, when N was supplied only as NH_4^+ than when it was provided just as NO_3^- (Fig. 2C, 3C). Furthermore, when the N concentration in the irrigation solution was 0.6 mM none of these variables exposed statistically significant differences between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments (Fig. 2C, 3C). These results are surely associated with the previously shown behavior of PN, as this physiological process is considered the most important for plant biomass accumulation (Evans and Clarke, 2019; Flood *et al*., 2011; Yamori, 2020); although probably there are also interactions between the factors and variables studied in this work, with other physiological processes as respiration, water absorption and transpiration.

In blueberry, fruit production depends mainly on the number of plant floral buds (Salvo *et al*., 2011; 2012; Kumarihami *et al*., 2021), whose induction is stimulated by factors such as temperature, light intensity and carbohydrates availability (Pescie *et al*., 2011; Salvo *et al*., 2012; Kumarihami *et al*., 2021). Carbohydrates metabolism plays a fundamental role, since it is a source of soluble sugars such as glucose and fructose, which act as energy providers and as signaling molecules that stimulate the metabolic processes involved in breaking bud dormancy (Wang *et al*., 2021). The first phases of the flower buds induction are sustained mainly by the reserve carbohydrates, and later by fruits photosynthesis, but fundamentally by leaves photosynthesis (Maust *et al*., 1999 a; b). In this context, the production and quality of the fruits is based on a source (leaves) sink (fruit) relationship, whose balance depends fundamentally on the factors that affect the photosynthetic activity of the leaves and the number of fruits (Jorquera-Fontena *et al*., 2018; Kumarihami *et al*., 2021). As previously showed, plants that received 6.0 mM N as NH_4^+, displayed the highest values of PN per unit of leaf surface and in plants that received 0.6 mM N there were no statistically differences between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments (Fig. 1C). The same pattern was observed in LA (Fig. 2C) and in SFW (Fig. 3C), therefore, according to the source-sink approach, it can be assumed that the behavior of LA and SFW was associated with photoassimilates availability.

FY and FD showed similar effects than PN, LA and SFW; plants that received 6.0 mM N as NH_4^+ were more than three times and 15 % higher, respectively, than those that received it as NO_3^- (Fig. 5C, 6C); therefore, it could be assumed that the effects showed by FY and FD depends likewise on carbohydrates availability (Maust *et al*., 1999 a; b). However, interestingly and in contrast to PN, LA and SFW, plants that received 0.6 mM N did show statistically significant differences between NH_4^+:NO_3^- proportion treatments in both variables. The FY and FD of plants that received only NH_4^+ were four times and 9.5 % higher, respectively, than those that received only NO_3^- (Fig. 5C, 6C). These results could be explained by an indirect effect of NH_4^+ on flower buds induction and fruit development, through a stimulus to the photosynthetic activity and the increase of photoassimilates availability, which may act as energy providers and/or signaling molecules (Li *et al*., 2013; Jorquera-Fontena *et al*., 2018; Maust *et al*., 1999 a; 1999b; Petridis *et al*., 2020; Wang *et al*., 2021). However, more research is needed to clarify and quantify this process.

CONCLUSIONS

The results of this work show that, in blueberry grown under hydroponic conditions, plant growth and fruit production were higher when N was supplied as NH_4^+, than when it was provided only as NO_3^-. These effects were manifested through higher values of net photosynthesis, leaf area, shoots fresh weight, fruit yield and fruit diameter. However, N concentration in the irrigation solution altered the effect of its ionic form and this pattern was only observed at high N concentration (6.0 mM), whereas at low N concentration (0.6 mM), these effects were only maintained in fruit yield and fruit diameter, but not in net photosynthesis, leaf area and shoots fresh weight. Considering that photosynthesis is a fundamental physiological process for plant growth and development and the intimate relationship between N and C metabolism, it is proposed that the effects of the concentration and the ionic form of N, on growth and fruit production of blueberry plants, were closely related to internal carbohydrates availability.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work was carried out as a part of the MSc thesis of

Mr. Jesús Alonso Luna Béjar, who was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) of the Mexican government and was directed by Dr. Raúl Cárdenas-Navarro. Special thanks to M.A in ELT. Mauricio Montes Cortés, from the Languages Department of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, for English editing service. This study was funded by the Consejo de la Investigación Científica (CIC) of the Universidad Michoacána de San Nicolás de Hidalgo.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors will not declare conflicts of interest.

REFERENCES

Araya, T., Noguchi, K. and Terashima, I. 2010. Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of Plant Research. 123:371-379. https://doi.org/10.1007/s10265-009-0279-8

Banados, M.P., Strik, B.C., Bryla, D.R. and Righetti, T.L. 2012. Response of highbush blueberry to nitrogen fertilizer during field establishment, I: accumulation and allocation of fertilizer nitrogen and biomass. HortScience. 47:648-655. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.5.648

Bolaños-Alcántara, M.N., Pineda-Pineda, J., Castro-Brindis, R., Vargas-Hernández, M. and Avitia-García, E. 2019. Nitrate/ammonium ratio and electrical conductivity in blueberry quality. Acta Horticulturae. 1265:233-240. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1265.33

Bryla, D.R. and Machado, R.M.A. 2011. Comparative effects of nitrogen fertigation and granular fertilizer application on growth and availability of soil nitrogen during establishment of highbush blueberry. Frontier in Plant Science. 2:46. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00046

Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S. and Robin, P. 1998. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. Journal of Experimental Botany. 49:721-730. https://doi.org/10.1093/jxb/49.321.721

Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J.M., Farías-Rodríguez, R. and Peña-Cabriales, J.J. 2004. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. Revista Chapingo Serie Horticultura. 10:173-178. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2002.07.039

Cárdenas-Navarro, R., López-Pérez, L., Lobit, P., Ruiz-Corro, R. and Castellanos-Morales, V.C. 2006. Effects of nitrogen source on growth and development of strawberry plants. Journal of Plant Nutrition. 29:1699-1707. https://doi.org/10.1093/jxb/49.321.721

Doyle, J.W., Nambeesan, S.U. and Malladi, A. 2021. Physiology of nitrogen and calcium nutrition in blueberry (*Vaccinium* sp.). Agronomy. 11:765. https://doi.org/10.3390/agronomy11040765

Ehret, D.L., Frey, B., Forge, T., Helmer, T., Bryla, D.R. and Zebarth, B.J. 2014. Effects of nitrogen rate and application method on early production and fruit quality in highbush blueberry. Canadian Journal of Plant Science. 94:1165-1179. https://doi.org/10.4141/cjps2013-401

Errebhi, M. and Wilcox, G.E. 1990. Plant species response to ammonium-nitrate concentration ratios. Journal of Plant Nutrition. 13:1017-1029. https://doi.org/10.1080/01904169009364132

Evans, J.R. and Clarke, V.C. 2019. The nitrogen cost of photosynthesis. Journal of Experimental Botany. 70:7-15. https://doi.org/10.1093/jxb/ery366

Flood, P.J., Harbinson, J. and Aarts, M.G.M. 2011. Natural genetic variation in plant photosynthesis. Trends Plant Science. 16:327-335. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.005

Jorquera-Fontena, E., Pastenes, C., Meriño-Gergichevich, C. and Franck, N. 2018. Effect of source/sink ratio on leaf and fruit traits of blueberry fruiting canes in the field. Science Horticulturae. 241:51-56. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.041

Korcak, R.F. 1989. Variation in nutrient requirements of blueberries and other calcifuges. HortScience. 24:573-578. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.24.4.573

Kumarihami, H.M.P.C., Park, H-G., Kim, S-M., Park, J-I., Lee, E-J., Kim, H.L. and Kim, J.G. 2021. Flower and leaf bud density manipulation affects fruit set, leaf-to-fruit ratio, and yield in southern highbush 'Misty' blueberry. Scientia Horticulturae. 290:110530. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110530

Leal-Ayala, O.G., Sandoval-Villa, M., Trejo-Téllez, L.I., Sandoval-Rangel, A., Cabrera-De La Fuente, M. and Benavides-Mendoza, A. 2021. Nitrogen form and root division modifies the nutrimental and biomolecules concentration in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobot Cluj Napoca. 49:11998. https://doi.org/10.15835/nbha49111998

Li, S-X., Wang, Z-H. and Stewart, B.A. 2013. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. Advance Agronomy. 118:205-397. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405942-9.00005-0

Lobit, P., López-Pérez, L., Cárdenas-Navarro, R., Castellanos-Morales, V.C. and Ruiz-Corro, R. 2007. Effect of ammonium/nitrate ratio on growth and development of avocado plants under hydroponic conditions. Canadian Journal of Plant Science. 87:99-103. https://doi.org/10.4141/P06-029

Marschner, H. 2011. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier Science, San Diego.

Maust, B.E., Williamson, J.G. and Darnell, R.L. 1999a. Effects of flower bud density on vegetative and reproductive development and carbohydrate relations in southern highbush blueberry. Journal American Society Horticultural Science. 124:532-538. https://doi.org/10.21273/JASHS.124.5.532

Maust, B.E., Williamson, J.G. and Darnell, R.L. 1999b. Flower bud density affects vegetative and fruit development in field-grown southern highbush blueberry. HortScience. 34:607-610. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.4.607

Messiga, A.J., Haak, D. and Dorais, M. 2018. Blueberry yield and soil properties response to long-term fertigation and broadcast nitrogen. Scientia Horticulturae. 230:92-101. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.019

Metcalfe, R.J., Nault, J. and Hawkins, B.J. 2011. Adaptations to nitrogen form: comparing inorganic nitrogen and amino acid availability and uptake by four temperate forest plants. Canadian Journal of Forest Research. 41:1626-1637. https://doi.org/10.1139/x11-090

Mu, X. and Chen, Y. 2021. The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. Plant Physiology and Biochemistry. 158:76-82. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.019

Osorio, R., Cáceres, C. and Covarrubias, J.I. 2020. Vegetative and physiological responses of "Emerald" blueberry to ammoniacal sources with a nitrification inhibitor. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 20:507-515. https://doi.org/10.1007/s42729-019-00135-7

Pescie, M., Lovisolo, M., De Magistris, A., Strik, B. and López, C. 2011. Flower bud initiation in southern highbush blueberry cv. O'Neal occurs twice per year in temperate to warm-temperate conditions. Journal of Applied Horticulture. 13:8-12. https://doi.org/10.37855/jah.2011.v13i01.02

Petridis, A., van der Kaay, J., Sungurtas, J., Verrall, S.R., McCallum, S., Graham, J. and Hancock, R.D. 2020. Photosynthetic plasticity allows blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants to compensate for yield loss under conditions of high sink demand. Environmental and Experimental Botany. 174:104031. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104031

Poonnachit, U. and Darnell, R. 2004. Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in *Vaccinium* species. Annals of Botany. 93:399-405. https://doi.org/10.1093/aob/mch053

Rosen, C.J., Allan, D.L. and Luby, J.J. 1990. Nitrogen form and solution pH influence growth and nutrition of two *Vaccinium* clones. Journal of American Society Horticultural Science. 115:83-89. https://doi.org/10.21273/JASHS.115.1.83

Salvo, S., Muñoz, C., Ávila, J., Bustos, J., Cariaga, E., Silva, C. and Vivallo, G. 2011. Sensitivity in the estimation of parameters fitted by simple linear regression models in the ratio of blueberry buds to fruits in Chile using percentage counting. Scientia Horticulturae. 130:404-409. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.042

Salvo, S., Muñoz, C., Ávila, J., Bustos, J., Ramírez-Valdivia, M., Silva, C. and Vivallo, G. 2012. An estimate of potential blueberry yield using regression models that relate the number of fruits to the number of flower buds and to climatic variables. Scientia Horticulturae. 133:56-63. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.020

Scheurwater, I., Koren, M., Lambers, H. and Atkin, K. 2002. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow- growing grass species. Journal of Experimental of Botany. 53:1635-1642. https://doi.org/10.1093/jxb/erf008

Vargas, O.L. and Bryla, D.R. 2015. Growth and fruit production of highbush blueberry fertilized with ammonium sulfate and urea applied by fertigation or as granular fertilizer. HortScience. 50:479-485. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.3.479

Wang, H., Xia, X. and An, L. 2021. Metabolomics analysis reveals the mechanism of hydrogen cyanamide in promoting flower bud break in blueberry. Agronomy. 11:102. https://doi.org/10.3390/agronomy11010102

Yamori, W. 2020. Photosynthesis and respiration. In Plant Factory 2nd ed. Kozai T, Niu G, Takagaki M (ed.), pp 197–206. Academic Press, London,

Yuan-Yuan, Z., Jun-Ping, T., Jun, C., Yu-Hui, H. and Yu-Shi, L. 2021. Effects of different NH^{4+}/NO^{3-} ratios on the photosynthetic and physiology responses of blueberry (*Vaccinium* spp.) seedlings growth. Journal of Plant Nutrition. 44:854–864. https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1871754

Zhang, X., Li, S., An, X., Song, Z., Zhu, Y., Tan, Y., Guo, X. and Wang, D. 2023. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium formula fertilization on the yield and berry quality of blueberry. PLoS One, 18:e0283137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283137

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Efecto bioestimulante de *Macrocystis pyrifera* en esporas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad contra *Chloridea virescens*

Biostimulant effect of *Macrocystis pyrifera* on *Metarhizium anisopliae* spores and its pathogenicity against *Chloridea virescens*

Lucía Araceli Manzanarez Jiménez [1]*

[1] Departamento de Biotecnología Agrícola, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.

ABSTRACT

The biostimulant effect of *Macrocystis pyrifera* on *Metarhizium anisopliae* spores was evaluated in its growth, sporulation, viability, and pathogenicity against *Chloridea virescens*. Nine concentrations were prepared at $1\times10^{7,8,9}$ spores/mL, with 5 %, 10 % and 20 % algae in SDA, plus three positive check, and incubated at 150 r.p.m, 28 °C, 80 % relative humidity and 8 h of light. Pathogenicity was tested on larvae two days after hatching. *M. pyrifera* had biostimulant effect on *M. anisopliae*, improving growth with 5 % and 10 %, to 4.91 µm/d, and with 20 % to 4.84 µm/d. Viability was around 99 % in germinated spores at 24 h for all treatments, the total sporulation was 6×10^{6} to 6.7×10^{8}, and with only fungus from 3×10^{6} to 3.4×10^{7} spores/mL. The highest mortality was 91.5 ± 2.5 % at 43.3 ± 1.3 h, and with only fungus, 80 ± 3 % at 70 ± 5 h. This work is a contribution to pest control with entomopathogenic fungi improved with extracts of marine origin. It is recommended to evaluate these treatments in conventional crop.

Keywords: Biotechnology, microorganisms, sustainable development

RESUMEN

Se evaluó el efecto bioestimulante de *Macrocystis pyrifera* en esporas de *Metarhizium anisopliae,* en su crecimiento, esporulación, viabilidad y patogenicidad contra *Chloridea virescens*. Se prepararon nueve concentraciones a $1\times10^{7,8,9}$ esporas/mL con 5 %, 10 % y 20 % de alga en SDA, más tres controles positivos, y se incubaron a 150 r.p.m, 28 °C, 80 % de humedad relativa y 8 h luz, la patogenicidad se probó sobre larvas de dos días de eclosión. *M. pyrifera* tuvo efecto bioestimulante en *M. anisopliae*, y mejoró con 5 % y 10 %, con crecimiento de 4.91 µm/d, y con 20 % 4.84 µm/d, la viabilidad fue alrededor de 99 % esporas germinadas a las 24 h en todos los tratamientos, la esporulación total fue 6×10^{6} a 6.7×10^{8}, y con solo hongo de 3×10^{6} a 3.4×10^{7} esporas/mL, la mortalidad más alta fue 91.5 ± 2.5 % a las 43.3 ± 1.3 h, y con solo hongo fue 80 ± 3 % a las 70 ± 5 h. Este trabajo es un aporte al control de plagas con hongos entomopatógenos mejorados con extractos de origen marino, se recomienda evaluar estos tratamientos en cultivo convencional.

Palabras clave: Biotecnología, microorganismos, desarrollo sostenible

INTRODUCCION

Los hongos entomopatógenos atacan insectos y ácaros, entre los géneros más estudiados se encuentran *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Isaria spp.* (=*Paecilomyces*), y *Lecanicillium* spp. (=*Verticillium*), los cuales producen conidios o esporas, responsables de causar la infección y dispersión de los hongos en el ambiente (Alatorre y Tamayo, 2020). *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (1883) es un hongo, generalista, filamentoso, saprofito y parásito, que crece en el suelo, en la rizosfera de las plantas y cadáveres de artrópodos, desarrolla hifas que dan origen al micelio y conidios patógenos que causan la enfermedad "muscardina verde" en insectos, su uso como agente de control biológico de plagas, no compromete la sanidad de los cultivos agrícolas y el ambiente (Inglis *et al*., 2012; Zelaya-Molina *et al*., 2022).

En México, el control biológico con hongos entomopatógenos y otros microorganismos es limitado, debido su efecto bioinsecticida prolongado, comparado con el rápido efecto de los insecticidas convencionales, lo anterior, ha influido en el incremento de un mayor uso de productos químicos, impactando en las poblaciones de insectos benéficos, y la microbiota del suelo (Archuleta-Torres, 2012; Zelaya-Molina *et al*., 2022). Este escenario ha propiciado la búsqueda de cepas nativas de microorganismos entomopatógenos con actividad insecticida, coadyuvada con polímeros naturales y otros microorganismos con efecto sinérgico, para aumentar su persistencia en el ambiente.

Una alternativa para lograrlo, es el uso de bioestimulantes que potencialicen su crecimiento y patogenicidad sobre los insectos, como *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, 1820 (Laminariales: Phaeophyceae), conocida como quelpo o alga cafe, rica en carbohidratos, minerales (Mg^{+2}, Ca^{+2}, P^{+5}, k^{+1}), vitaminas (tocoferol, B_1 y B_{12}), con capacidad para estimular el crecimiento vegetal de las plantas a través de mecanismos como fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de minerales (Hernández-Carmona *et al*., 2012). En México *M. pyrifera* crece de manera silvestre en la costa oeste de la península de Baja California, desde Tijuana, B.C.N., hasta Bahía Asunción, B.C.S., y se cosecha de forma manual para producir extractos líquidos por métodos hidrotermales en condiciones alcalinas, neutras y ácidas (Hernández-Herrera *et al*., 2018), su colecta genera alrededor de 31,835 millones de t/año, de esta producción, el 7 % se obtiene en México y Chile (FAO, 2018).

*Autor para correspondencia: Lucía Araceli Manzanarez Jiménez
Correo-e: lmanzanarezj1800@alumno.ipn.mx
Recibido: 4 de Mayo de 2024
Aceptado: 13 de Junio de 2024
Publicado: 04 de Julio de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2321

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto bioestimulante de un extracto líquido de *M. pyrifera* en esporas del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a diferentes concentraciones, sobre larvas de dos días de eclosión del gusano del fruto en tomate *Chloridea virescens* F. = *Heliothis virescens* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae), con base en su crecimiento, germinación, concentración, y patogenicidad, en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioinsecticidas del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional en Guasave, Sinaloa, México, de marzo a junio de 2023.

Origen de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae se aisló de muestras de suelo agrícola en el laboratorio de bioinsecticidas del CIIDIR IPN Sinaloa, y se identificó por la morfología de sus conidios y por métodos moleculares mediante la extracción de ADN genómico de micelio, amplificando las regiones ITS1, 5.8S, ITS2 de ARNr, utilizando los cebadores ITS1F-ITS4 (Archuleta-Torres, 2012).

Colecta de *Macrocystis pyrifera* y preparación del extracto

M. pyrifera se colectó en las costas de Baja California Sur, el extracto líquido se obtuvo en el Laboratorio de Química de Algas del CICIMAR IPN, en La Paz, B.C.S. México, mediante extracción alcalina (Hernández–Carmona *et al.,* 2012).

Preparación de las concentraciones de esporas de *M. anisopliae*

Las esporas en polvo de *M. anisopliae*, se propagaron en arroz precosido, inoculado con un cultivo líquido del hongo, donde se adicionaron sales minerales y carbono. Se incubó a 28 °C, humedad relativa de 80 %, 8 horas luz, durante 14 d, las esporas cosechadas se almacenaron a 4 °C (Manzanarez-Jiménez y García-Gutiérrez, 2020). Las concentraciones iniciales se prepararon a partir de tubos cónicos con tapa de rosca de 15 mL, donde se vertió 0.01 gramos de esporas en 10 mL de Tween® 80 al 0.05 %, enseguida se mezclaron en un vortex y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} en microtubos de 1000 µL, para obtener las concentraciones a 1×10^{7}, 1×10^{8} y 1×10^{9} esporas/mL.

Cultivo de *M. anisopliae* con *M. pyrifera*

En matraces de 50 mL, se prepararon 20 mL de caldo dextrosa sabouraud (SDA) y se agregaron las concentraciones correspondientes de *M. anisopliae* ($1\times10^{7,8,9}$ esporas/mL), y el extracto líquido de alga *M. pyrifera* (5 % 10 % y 20 %), más tres controles positivos con solo hongo, y se cultivaron en una incubadora de agitación (LAB Companion, SR-600R) a 150 r.p.m., 28 °C, humedad relativa de 80 %, y 10 h luz, durante cinco días.

Evaluación del crecimiento, germinación y concentración de esporas

El crecimiento del hongo se evaluó a partir de las primeras 24 h de cultivo; en un portaobjetos se colocaron 10 µL del cultivo líquido con 1 µL de azul de algodón para identificar las estructuras del hongo y se cubrieron con un cubreobjetos, después con el objetivo 40 X de un microscopio óptico (Primo Star Carl Zeiss®), se midió la longitud de las hifas en micras. La viabilidad de esporas se midió en medio PDA, en cada caja de cultivo del tratamiento correspondiente se agregaron 50 µL de azul de algodón cargados en una micropipeta (Labmate Pro®), después se extrajo 1 cm^2 del cultivo del hongo, y se colocó al centro en un portaobjetos, enseguida se cubrió con un cubreobjetos, y se contó el número de esporas germinadas, notando que su tamaño fuera dos veces mayor al tamaño de su tubo germinal. La concentración total de esporas de los tratamientos, se evaluó mediante diluciones de 10^{-1} a 10^{-5}, que se contaron en cámara de Neubauer (Inglis *et al.* 2012). Todos los tratamientos contaron con cinco unidades experimentales y tres repeticiones. Las variables evaluadas fueron crecimiento del hongo (longitud en micras), germinación de esporas a las 24 h, y concentración total de esporas a los cinco días.

Bioensayo de patogenicidad

Las larvas de dos días de eclosión se individualizaron en cámaras húmedas hechas con cajas petri (60 × 15 mm), con una base de papel filtro humedecido con 0.5 mL de agua destilada, donde se colocó 1 g de dieta artificial,inoculada con 10 µL del tratamiento correspondiente y se sellaron con cinta Parafilm. Las cajas se incubaron a 27 ± 1 °C, humedad relativa > 80 % y 8 h luz. La mortalidad se evaluó cada 24 h, durante cinco días (Tabla 1).

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó en un diseño completamente al azar. Los datos de crecimiento, esporulación, viabilidad y mortalidad de larvas se presentan en promedios ± desviación estándar. Las variables se analizaron con el estadístico ANOVA, y las diferencias entre los tratamientos se establecieron con una comparación de medias con la prueba de Tukey

Tabla 1. Tratamientos y su concentración en el bioensayo de patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Chloridea virescens*. El bioensayo contó con 30 unidades experimentales por tratamiento y se replicó tres veces, bajo las mismas condiciones experimentales

Table 1. Treatments and their concentration in the pathogenicity bioassay of *Metarhizium anisopliae* against *Chloridea virescens* larvae. The bioassay had 30 experimental units per treatment and was replicated three times, under the same experimental conditions.

Tratamientos	Concentraciones
T1	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de *M. anisopliae* + 5 % *M. pyrifera*
T2	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de *M. anisopliae* + 10 % *M. pyrifera*
T3	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de *M. anisopliae* + 20 % *M. pyrifera*
T4	$1 \times 10^{7,8,9}$ esporas/mL de *M. anisopliae* en 10 mL de Tween 80 al 0.05%
T5	Agua destilada

($p \leq 0.05$) (SAS Institute 2009). El tiempo letal medio en que los tratamientos mataron a la mitad de la población de larvas se determinó mediante un análisis Probit (Finney, 1964).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del crecimiento, germinación y concentración de esporas

El extracto de *M. pyrifera* tuvo efecto bioestimulante en el crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo, en el medio de cultivo líquido.

Los hongos que fueron tratados con 5 %, 10 % y 20 % de extracto líquido *de M. pyrifera* como estrategia para mejorar su crecimiento y concentración mostraron datos de crecimiento significativamente mayores con respeto al control positivo ($F = {}_{30958.03} = 2.80$; gl = 3,32; $p = 0.00$), ($F_{33833.03} = 2.90$; gl = 4,41; $p = 0.00$), respectivamente (Tabla 2).

En los tratamientos del hongo con 5 % y 10 % de extracto líquido de *M. pyirifera*, las hifas crecieron en promedio 4.91 µm/día y con 20 % 4.84 µm/d, en los tratamientos con solo hongo estos valores fueron de 2.00 a 2.11 µm/d. Estos resultados concuerdan con Manzanarez-Jiménez *et al*. (2021) quienes encontraron crecimiento fúngico de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *M. anisopiliae* en un cultivo sólido a base de almidón y dextrosa con 2 % de extracto semi-líquido de *M. pyrifera*. Por su parte, Hernández-Herrera *et al.* (2014) informaron de la germinación de semillas y crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), y frijol mungo (*Vigna radiata* L.) R. Wilezek, con extractos de algas de la familia Laminariaceae (algas cafes). Los resultados de los trabajos anteriores refuerzan la idea de sinergia entre microorganismos compatibles, para incrementar el crecimiento y la persistencia de éstos en cultivos agrícolas, y el control biológico de plagas de insectos. En este trabajo, las concentraciones < o = 20 % de extracto líquido de *M. pyrifera* benefició el crecimiento, germinación y concentración del hongo *M. anisopliae* en un cultivo líquido, y mejoró con 5 % y 10 %, estos resultados son prometedores para promover el uso de bioestimulantes y superar las limitaciones por efecto de la luz solar y la falta de humedad relativa en los hongos entomopatógenos, como lo informaron Manzanarez-Jiménez *et al.* (2021), quienes evaluaron la persistencia de una formulación de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con

Tabla 2. Efecto de esporas de *Metarhizium anisopliae* con extracto *Macrocystis pyrifera*, en el crecimiento de hifas, y esporulación total del hongo.
Table 2. Effect of *Metarhizium anisopliae* spores with extract of *Macrocystis pyrifera* on hyphal growth, and total sporulation of the fungus.

Concentración inicial	Crecimiento del hongo µm/día			Esporulación total esporas/mL		
			T1: 5%			
1×10^7	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.91 ± 0.0^{a}	4.92 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	$6.3 \times 10^{7\,a}$	$6.4 \times 10^{8\,a}$	$6.4 \times 10^{8\,a}$
Control	2.02 ± 0.0^{b}	2.02 ± 0.0^{b}	2.02 ± 0.0^{b}	$3.1 \times 10^{8\,b}$	$3.2 \times 10^{7\,b}$	$3.2 \times 10^{6\,b}$
			T2: 10%			
Tratamiento	4.91 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	4.92 ± 0.00^{a}	$6 \times 10^{6\,a}$	$6 \times 10^{7\,a}$	$6.2 \times 10^{7\,a}$
Control	2.01 ± 0.0^{b}	2.01 ± 0.0^{b}	2.01 ± 0.0^{b}	$3 \times 10^{6\,b}$	$3 \times 10^{6\,b}$	$3.3 \times 10^{5\,b}$
			T3: 20%			
Tratamiento	4.85 ± 0.1^{b}	4.84 ± 0.1^{b}	4.84 ± 0.1^{b}	$6.2\times10^{8\,a}$	$6.7 \times 10^{7\,a}$	$6 \times 10^{8\,a}$
Control	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	$3.2\times10^{8\,b}$	$3 \times 10^{7\,b}$	$3 \times 10^{6\,b}$
			T1:5 %			
1×10^8	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.92 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	$6.7 \times 10^{7\,a}$	$6.9 \times 10^{8\,a}$	$6.8 \times 10^{8\,a}$
Control	2.10 ± 0.0^{c}	2.02 ± 0.0^{c}	2.01 ± 0.0^{c}	$3.1 \times 10^{8\,b}$	$3.3 \times 10^{7\,b}$	$3 \times 10^{6\,b}$
			T2:10 %			
Tratamiento	4.91 ± 0.0^{a}	4.92 ± 0.0^{a}	4.92 ± 0.00^{a}	$6.2 \times 10^{6\,a}$	$6.4 \times 10^{7\,a}$	$6.2 \times 10^{7\,a}$
Control	2.12 ± 0.0^{c}	2.11 ± 0.0^{c}	2.01 ± 0.0^{c}	$3.4 \times 10^{6\,b}$	$3 \times 10^{6\,b}$	$3.3 \times 10^{5\,b}$
			T3: 20 %			
Tratamiento	4.72 ± 0.1^{b}	4.69 ± 0.1^{b}	4.71 ± 0.1^{b}	$6.5 \times 10^{8\,a}$	$6.9 \times 10^{8\,a}$	$6.2 \times 10^{8\,a}$
Control	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	$3.1 \times 10^{8\,b}$	$3.4 \times 10^{7\,b}$	$3.3 \times 10^{6\,b}$
			T1:5 %			
1×10^9	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Tratamiento	4.90 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	4.90 ± 0.0^{a}	$6.8 \times 10^{7\,a}$	$6.8 \times 10^{8\,a}$	$6.6 \times 10^{8\,a}$
Control	2.10 ± 0.0^{c}	2.02 ± 0.0^{c}	2.01 ± 0.0^{c}	$3.1 \times 10^{8\,b}$	$3.3 \times 10^{7\,b}$	$3 \times 10^{6\,b}$
			T3:10 %			
Tratamiento	4.93 ± 0.0^{a}	4.91 ± 0.0^{a}	4.92 ± 0.00^{a}	$6.6 \times 10^{6\,a}$	$6.5 \times 10^{7\,a}$	$6.6 \times 10^{7\,a}$
Control	2.10 ± 0.0^{c}	2.11 ± 0.0^{c}	2.11 ± 0.0^{c}	$3.2\times10^{6\,b}$	$3.3 \times 10^{6\,b}$	$3.3 \times 10^{5\,b}$
			T3:20 %			
Tratamiento	4.69 ± 0.1^{b}	4.67 ± 0.1^{b}	4.70 ± 0.1^{b}	$6.2 \times 10^{8\,a}$	$6.2 \times 10^{7\,a}$	$6.4 \times 10^{8\,a}$
Control	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	2.00 ± 0.0^{c}	$3.1 \times 10^{8\,b}$	$3.4 \times 10^{7\,b}$	$3.3 \times 10^{6\,b}$

aceite mineral y extracto semi-líquido de *M. pyrifera* sobre plantas de tomate de invernadero en condiciones de baja humedad relativa, encontrando esporas de éstos hongos adheridas en hojas de la planta de tomate a los 14 días después de haber sido aplicados. Manzanarez-Jiménez *et al*. (2022), encontraron alta tolerancia a la temperatura de esporas de *M. anisopliae* formuladas con extracto semi-líquido de origen marino y otros polisacáridos en microcápsulas procesadas en un secador de rocío.

Los valores de concentración total de esporas con *M. pyrifera*, fueron 6×10^6 a 6.7×10^8, y con solo hongo de 3×10^6 a 3.4×10^7 esporas/mL, estos resultados promueven la producción de esporas coadyuvadas con extractos de origen marino, ya que una mayor disponibilidad de inóculo resulta competitivo para producir esporas en polvo mediante esquemas biotecnológicos desde el ámbito comercial, sin embargo, desde la perspectiva de disponibilidad de esporas para causar la muerte de los insectos, en esta trabajo se comprobóó que en las concentraciones evaluadas no presentaron diferencias estadísticas significativas en las variables evaluadas ($F_{31151.05} = 2.89$; gl = 3,72; $p = 0.08$) (Tabla 2).

La germinación del hongo no registró datos significativos entre el hongo con extracto de *M. pyrifera* y el hongo solo, todos los tratamientos tuvieron alrededor de 99 % de esporas germinadas a las 24 h ($F_{35642.05} = 2.80$; gl = 3,81; $p = 0.07$), (Tabla 3), estos resultados muestran la capacidad de *M. anisopliae* para reproducirse a partir del crecimiento de las hifas, y originar nueva esporas, con la posibilidad de iniciar nuevos ciclos de infección sobre los insectos.

Tabla 3. Germinación de esporas de *Metarhizium anisopliae* en extracto de *Macrocystis pyrifera*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (α = 0.05). Los datos muestran los promedios de las réplicas experimentales ± la desviación estándar.

Table 3. Spore germination of *Metarhizium anisopliae* in *Macrocystis pyrifera* extract. Different letters indicate statistical differences between treatments (α = 0.05). Data show means of experimental replicates ± standard deviation.

Repetición	Tratamientos	Germinación de esporas (%) 24 h		
		1×10^7	1×10^8	1×10^9
		5%		
1	Tratamiento	99.0 ± 1.82^a	99.0 ± 0.11^a	99.4 ± 0.22^a
	Control	99.7± 0.22^a	99.3 ± 1.40^a	99.7 ± 1.67^a
2	Tratamiento	99.8 ± 0.81^a	99.4 ± 0.89^a	99.8 ± 1.30^a
	Control	99.8 ± 1.30^a	99.4 ± 0.89^a	99.7 ± 1.67^a
3	Tratamiento	99.7 ± 0.71^a	99.3 ± 1.41^a	99.4 ± 1.14^a
	Control	99.6 ± 1.82^a	99.3 ± 1.87^a	99.8 ± 1.30^a
		10%		
1	Tratamiento	99.6 ± 1.82^a	99.0 ± 1.41^a	99.2 ± 1.22^a
	Control	99.3 ± 1.22^a	99.3 ± 1.40^a	99.6 ± 0.67^a
2	Tratamiento	99.8 ± 1.81^a	99.4 ± 1.30^a	99.5 ± 0.30^a
	Control	99.8 ± 1.43^a	99.4 ± 1.40^a	99.6 ± 1.87^a
3	Tratamiento	99.9 ± 1.21^a	99.3 ± 1.47^a	99.6 ± 1.24^a
	Control	99.8 ± 1.15^a	99.3 ± 1.20^a	99.6 ± 1.40^a
		20%		
1	Tratamiento	99.8 ± 1.40^a	99.5 ± 1.20^a	99.4 ± 1.52^a
	Control	99.9 ± 1.30^a	99.4 ± 1.22^a	99.7 ± 1.82^a
2	Tratamiento	99.6 ± 1.16^a	99.3 ± 1.49^a	99.8 ± 1.12^a
	Control	99.4 ± 1.31^a	99.4 ± 1.49^a	99.7 ± 1.23^a
3	Tratamiento	99.4 ± 0.89^a	99.6 ± 1.51^a	99.4 ± 1.20^a
	Control	99.3 ± 1.22^a	99.4 ± 1.47^a	99.8 ± 1.24^a

Bioensayo de patogenicidad

La patogenicidad de los tratamientos de hongo con *M. pyrifera* presentó diferencia significativas con respecto al control positivo y negativo ($F = _{30766.01} = 2.60$; gl = 3,42; $p = 0.00$) (Tabla 4, Figura 1).

Los hongos entomopatógenos pueden ser aplicados directamente sobre el cultivo infestado con la plaga, mediante suspensiones mezcladas con un surfactante, para mejorar la dispersión de esporas, sin embargo, es importante mejorar las técnicas de liberación en campo y el uso de coadyuvantes para incrementar su actividad bioinsecticida sobre las poblaciones de insectos. Al respecto, el uso de aceites vegetales y

Tabla 4. Mortalidad de larvas de *Chloridea virescens* y tiempo letal medio (TL_{50}) por efecto de los tratamientos aplicados. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (α = 0.05). Los datos muestran los promedios de las réplicas experimentales ± la desviación estándar. H+E*= *M. anisopliae* + extracto de macro-alga. H* = *M. anisopliae.* TL50* = tiempo transcurrido entre la aplicación de los tratamientos y el momento en que muere el 50% de la población de insectos.

Table 4. Mortality of *Chloridea virescens* larvae and average lethal time (TL_{50}) due to the effect of the treatments applied. Different letters indicate significant statistical differences between treatments (α = 0.05). The data show the averages of the experimental replicates ± the standard deviation. H+E* = *M. anisopliae* + macro-algae extract. H* = *M. anisopliae*. TL50* = is the time elapsed between the application of the treatments and the moment in which 50 % of the insect population dies.

Tratamientos	Mortalidad (%) al día 5			TL_{50}* horas
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 5 %	91 ± 2 ^{a}	90 ± 3 ^{a}	91 ± 1 ^{a}	42.0 ± 1
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 10 %	92 ± 3 ^{a}	91 ± 4 ^{a}	93 ± 2 ^{a}	44.0 ± 1
$1 \times 10^{7,8,9}$ H + E* 20 %	92 ± 3 ^{a}	92 ± 3 ^{a}	92 ± 3 ^{a}	44.0 ± 2
$1 \times 10^{7,8,9}$ H (C+)	80 ± 3 ^{b}	81 ± 3 ^{b}	80 ± 2 ^{b}	70.0 ± 5
Agua destilada (C–)	00 ± 0 ^{c}	00 ± 0 ^{c}	00 ± 0 ^{c}	00.0 ± 0

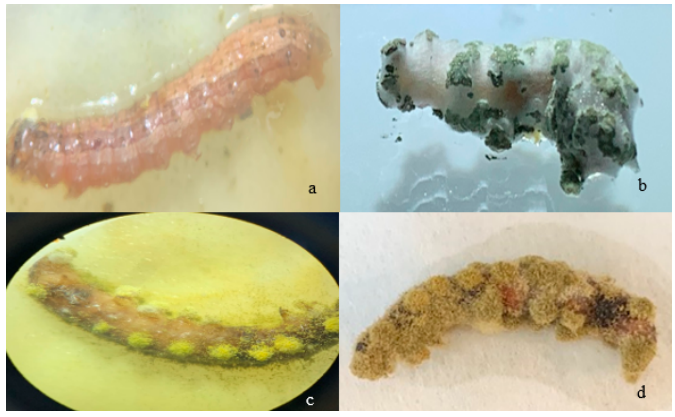


Figura 1. Efecto de los hongos con extracto líquido de alga *Macrocystis pyrifera* en larvas *Chloridea virescens*. Imágenes representativas del bioensayo de patogenicidad de los tratamientos aplicados, donde se aprecia el crecimiento del hongo sobre el cuerpo de las larvas a) Larva muerta por efecto del hongo y el alga, de seis días postratamiento, b) Crecimiento del hongo de diez dias sobre el cuerpo del insecto, en color blanco, y en algunas partes se observa color verde, c) Cuerpo de una larva de 14 días, con micelio, d) Cuerpo momificado de larva a los 18 días.

Figure 1. **Effect of fungi with *Macrocystis pyrifera* algae liquid extract on *Chloridea virescens* larvae**. Pictures of pathogenicity bioassay of the applied treatments are shown, where the evolution of fungus growth on the insects body is showing, a) Dead larva by effect of the fungus and the alga at 6-day post-treatment, b) Growth of the 10-day-old fungus on the body of the insect, in white, and in some in green, c) Body of a 14-day-old larva, with mycelium, d) Mummified body 18-day old larva.

minerales, así como polímeros a base de glucosa y proteínas de origen animal, y vegetal, son materiales recomendados para proteger las esporas del hongo de condiciones adversas y mejorar su actividad biológica (Vega-Aquino *et al*., 2010). En este trabajo la patogenicidad del hongo con el extracto líquido de *M. pyrifera* sobre larvas de *C. virescens* fue efectiva, las larvas murieron en un tiempo corto, comparado con el hongo sin alga, estos resultados con acordes a los reportados por Manzanarez-Jiménez *et al.* (2022), quienes informaron mortalidad superior al 50 % de larvas de mayor edad de *C. virescens*, por efecto de esporas de *M. anisopliae* liberadas de una matriz de maltodextrina y otra de gelatina bovina, adheridas a la cutícula de las larvas muertas, lo cual resulta importante para el control biológico con hongos entomopatógenos, ya que su disponibilidad en el cuerpo del insecto ayuda a dispersar las esporas e infectar a un mayor número de insectos (Vega-Aquino *et al*., 2010; Inglis *et al*., 2012).

El efecto de *M. pyrifera* en las esporas del hongo *M. anisopliae* evaluadas en este trabajo, mostró potencial para ser utilizado en beneficio del crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo en condiciones controladas, estos resultados son prometedores para aumentar la persistencia del hongo en la rizosfera (García *et al.,* 2011), en las hojas de las plantas y en condiciones ambientales de baja humedad relativa (Manzanarez-Jiménez *et al*., 2021; Manzanarez-Jiménez *et al*., 2022), así como para el control de *C. virescens*, cuyas poblaciones tienen habilidad para desarrollar resistencia a algunos productos químicos usados para su control (Terán-Vargas *et al*., 2005), y capacidad para desarrollarse rápidamente en el cultivo (Manzanarez-Jiménez *et al*., 2021).

CONCLUSIONES

El extracto líquido de origen marino de alga café *M. pyrifera* a bajas concentraciones benefició el crecimiento, viabilidad, esporulación y patogenicidad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* contra *C. virescens*. Las concentraciones del hongo evaluadas en este trabajo no afectaron las variables evaluadas. La mortalidad de larvas fue mayor con el hongo con *M. pyrifera* y el tiempo letal medio fue más corto. Este trabajo es un aporte al control biológico de plagas con hongos entomopatógenos tratados con extracto líquidos de origen marino, de amplia disponibilidad en el ambiente y ricos en nutrientes, como una alternativa para aumentar la actividad bioinsecticida de agentes de control biológico de insectos en cultivos agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCYT por la beca otorgada para estudio de "Estancias posdoctorales por México 2022 (3) en la modalidad: Estancia Posdoctoral Académica a la Doctora Lucía Araceli Manzanarez Jiménez, con el proyecto "Desarrollo de nuevos bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos para el control de plagas en tomate y chile en Sinaloa", y a CIIDIR IPN unidad Sinaloa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos, no tener conflictos de intereses con la presente publicación.

REFERENCIAS

Alatorre, R. R., y Tamayo, M. F. 2020. Protozoarios-microsporidia y hongos entomopatógenos. En J. Arredondo-Bernal, F. Tamayo-Mejía, y L. Rodríguez del Bosque. Eds., *Fundamento y práctica del control biológico de plagas y enfermedades* (pp. 187–238). Montecillo, Texcoco, Estado de México: Editorial del Colegio de Postgraduados, 1ra edición.

Archuleta-Torres, A. 2012. *Caracterización morfológica y molecular de Beauveria bassiana (Bálsamo) Viullemin y Metrahizium anisopliae (Metsch.) Sorokin de suelos cultivados y no impactados en el norte de Sinaloa.* Tesis de Mestría. Guasave, Sinaloa, México: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional.

FAO. 2018. *The global status of seaweed production, trade and utilization*. Globefish Research Programme Volume 124. Rome.120 pp Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Finney, D. J. 1978. Statistical method in biological assay. 3rd ed. D. J. Finney, Eds. New York: Cambridge University Press, p. 508.

García, J., Posadas, J., Perticari, A., y Lecuona, R. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research, 51*, 22–27.

Hernández–Carmona, G., Rodríguez–Montesinos, Y., Arvizu–Higuera, D., Reyes–Tisnado, R., Murillo–Álvarez, Y., y Muñoz–Ochoa, M. 2012. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, investigación y tecnología, 13*(2), 155–168.

Hernández-Herrera, R., Santacruz-Ruvalcaba, F., Briceño-Domínguez, D., Di Filippo-Herrera, D., y Hernández-Carmona, G. 2018. Seaweed as potential plant growth stimulants for agriculture in Mexico. *Hidrobiológica, 28*(1), 129–140.

Hernández-Herrera, R., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M., Norrie, J., y Hernández-Carmona, G. 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J Appl Phycol, 26*, 619–628.

Inglis, G. D., J. Enkerli, y M. S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, pp. 189-253. En L. Lacey [ed.], Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Academic Press, Londres.

Manzanarez-Jiménez, L., y García-Guitérrez, C. 2020. Producción de esporas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* por cultivo bifásico y su patogenicidad contra *Heliothis virescens* F. En SEPI-UPIICSA-IPN, M. Cruz-Antonio, C. Merlo-Zapata, y C. Máquez-Sánchez, Eds., *Memorias: 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria. Enfrentando Retos Emergentes de Ciencia y Tecnología* (pp. 123-126). Ciudad de México: Ecoe Ediciones México.

Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Flores-Zamora, G., Graciano-Obeso, A., y Luis, Leal-Jiménez. 2021. *Desarrollo, hábitos y daño de Chloridea virescens en tomate rojo cultivado en transpatio*. En Memorias del XLIII Congreso Nacional de Control Biológico. M. España-Luna, B. Rodríguez-Veléz, y H. González-Hernández, Eds. Chihuahua, Chihuahua. Sociedad Mexicana de Control Biológico, A.C.

Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N., Luna-González, A., y Ortega-Avilés, M. 2022. Formulaciones micro encapsuladas de *Metarhizium anisopliae* contra el Gusano tabacalero. *Southwestern Entomologist, 47*(4), 895–902.

Manzanarez-Jiménez, L., García-Gutiérrez, C., Verdugo-Mancillas, L., y Hernández-Carmona, G. 2021. Viabilidad de conidias de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en medio de cultivo con extracto de *Macrocystis pyrifera* (L.). En CNRG-INIFAP, *Memorias Agroevento Microorganismos para el Desarrollo.* 2da ed., Vol. 1, p. 141. Ciudad de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Manzanarez-Jiménez, L., Rosas-García, N., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C., y García-Gutiérrez, C. 2021. Evaluación de formulaciones en aceites de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Chloridea virescen*s F. *Southwestern Entomologist, 46*(2), 503–510.

SAS Institute. 2009. STAT/SAS User's Guide, 9.0. ed. SAS Institute Cary, NC, pp.67.

Terán-Vargas, A., Rodríguez, J., Blanco, C., Martínez-Carrillo, J., Cibrián-Tovar, J., Sánchez-Arroyo, H., L A Rodríguez-del-Bosque y Stanley, D. 2005. Bollgard cotton and resistance of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in southern Tamaulipas, Mexico. *J Econ Entomol, 98*(6), 2203–2209.

Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., y Blanco, A. C. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous. *Journal of Invertebrate Pathology, 103*(3), 145–149.

Zelaya-Molina, L., Chávez-Díaz, I., de los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C., Ruíz-Ramírez, S., y Rojas-Anaya, E. 2022. Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas, 13*(7), 69–79.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo original

Componentes de rendimiento de cártamo en mínima labranza y rotación de cultivos comparado con labranza tradicional

Yield components in safflower under minimum tillage and crop rotation compared to traditional tillage

Alberto Borbón Gracia[1], Gabriel Antonio Lugo García[2], Carlos Patricio Sauceda Acosta[2], Víctor Valenzuela Herrera[3], Xochilt Militza Ochoa Espinoza[1*3]✉

[1] Campo Experimental Norman E. Borlaug. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Calle Dr. Norman E. Borlaug km. 12, Col. Valle del Yaqui, CP. 85000, Cd. Obregón, Sonora, México.

[2] Universidad Autónoma de Sinaloa, Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Calle 16 y Avenida Japaraqui, CP. 81110, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México.

[3] Campo Experimental Valle de Culiacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Carretera Culiacán-el Dorado km. 17.5, CP. 80398, Culiacán Sinaloa, México.

RESUMEN

En cártamo, estudios sobre el impacto de labranza de conservación (LC) en el rendimiento y sus componentes son limitados, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento de cártamo y sus componentes en labranza tradicional (LT) y LC con rotación de cultivos. El estudio se realizó en el sur de Sonora, México, durante los ciclos otoño-invierno 2019-2020 y 2020-2021. El diseño experimental fue bloques al azar con arreglo factorial, los tratamientos fueron cártamo/maíz, cártamo/trigo y cártamo/cártamo en LC y cártamo/cártamo en LT, la variedad utilizada fue SEMAY-OL. Se determinaron variables agronómicas y rendimiento. El mayor rendimiento de grano se obtuvo en cártamo/maíz y cártamo/trigo en LC, mientras que el menor rendimiento se presentó en monocultivo en LC y LT. El sistema de labranza no mostró efecto sobre el peso de mil granos (PMG), plantas m^{-2} y diámetro del tallo. El número de capítulos m^{-2}, PMG, peso hectolítrico y número de granos por capítulo presentaron asociación positiva con el rendimiento de grano. El sistema de labranza con rotación de cultivos presenta influencia sobre componentes de rendimiento con excepción del PMG. La rotación de cultivos en el sistema de LC permite incrementar el rendimiento de esta oleaginosa.

Palabras clave: monocultivo, labranza de conservación, *Carthamus tinctorius* L.

ABSTRACT

In safflower, studies on the impact of conservation tillage (LC) on yield and its components are limited, so the objective of this study was to evaluate grain yield and yield components in conventional tillage (LT) and LC with crop rotation. The study was conducted in southern Sonora, Mexico, during the fall-winter 2019-2020 and 2020-2021 cycles. The experimental design was randomized blocks with factorial arrangement, the treatments were the rotation safflower/corn, safflower/wheat and safflower/safflower in LC and safflower/safflower in LT, the variety used was SEMAY OL. Agronomic variables and yield were determined. The highest grain yield was obtained in the safflower/corn and safflower/wheat rotation in LC, while the lowest yield was in monoculture in LC and LT. The tillage system showed no effect on weight of a thousand grain (PMG), plants m^{-2} and stem diameter. The number of chapters m^{-2}, the PMG, the grain weight and the number of grains per chapter, showed a positive association with the grain yield. The tillage system in combination with crop rotation has an influence on the yield components with the exception of PMG. Crop rotation in the LC system allows to increase the yield of this oilseed.

Keywords: monocultive, conservation tillage, *Carthamus tinctorius* L.

INTRODUCCIÓN

El cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) es un cultivo que se produce en varias regiones del mundo (da Silva *et al*., 2015), inicialmente se utilizaba para la extracción de color de sus pétalos (Sirel y Aytac, 2016) pero su principal virtud es producir uno de los aceites de mayor calidad para el consumo humano (Ávila *et al*., 2017). Kazajstán, México, La Federación Rusa, India y Estados Unidos de América destacan como los principales productores. Durante el periodo de 2010 al 2019 nuestro país se ubicó como el segundo mayor productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2021). A nivel nacional la superficie cosechada en promedio, desde el 2018 al 2023, fue de 29,356 ha, con una producción media anual de 52,482 t, de las cuales el estado de Sonora aportó el 44.7 % del volumen total de la producción, colocando a la entidad como productora principal de esta oleaginosa (SIAP, 2024).

La producción nacional de esta oleaginosa permite cubrir sólo el 80 % del requerimiento en el país y el resto se importa de Estados Unidos de América (SIAP, 2019), situación acentuada por una reducción acelerada de la superficie establecida con cártamo en México. Un escenario similar se presentó a nivel estatal en Sonora, de 42,495 ha que se

*Autor para correspondencia: Xochilt Militza Ochoa Espinoza
Correo-e: ochoaxochilt@gmail.com
Recibido: 29 de abril de 2024
Aceptado: 13 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2317

sembraron en promedio del 2010 al 2012 pasaron a 10,096 ha cosechadas del 2018 al 2023, lo que representa un 23.7 % de la superficie que se sembraba hace 10 años (SIAP, 2024).

El descenso de la superficie ocupada por esta oleaginosa obedece a la rentabilidad que ofrecen otros cultivos como el trigo y el maíz, aunque éstos requieren una mayor inversión que el cártamo (FIRA, 2018) y cada ciclo disminuyen las ganancias por un constante incremento en el precio de los combustibles y de los insumos como la semilla y los fertilizantes. Además, su demanda hídrica es mucho mayor, esto es de suma relevancia debido a que en la región del sur de Sonora el déficit de agua para riego agrícola es recurrente (CONAGUA, 2024), por lo cual el cártamo representa una alternativa por su bajo requerimiento hídrico (Aguilera *et al*., 2021; Hussain *et al*., 2015; Bishwoyog *et al*., 2020).

Lo anterior genera la necesidad de incrementar la rentabilidad del cultivo de cártamo, aspecto que se puede mejorar mediante la siembra directa (SD) o labranza de conservación (LC), combinada con rotación de cultivos. En este cultivo, los estudios agronómicos sobre el impacto de la SD en el rendimiento y sus componentes son limitados; o bien, solo se consideran como parte de la descripción varietal y en condiciones de labranza tradicional (Valadez y Cervantes, 2017; Borbón *et al*., 2019), por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento del cártamo y sus componentes en labranza tradicional (LT) y LC con rotación de cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó en el Sitio Experimental Valle del Mayo, Navojoa, Sonora, México, perteneciente al Campo Experimental Norman E. Borlaug del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado geográficamente a 27° 00′47″LN, 109° 30′03″LO y 39 msnm. El clima en la región presenta una temperatura promedio anual de 22.7 °C, con mínima media de 14 °C y máxima de 31.4 °C, con precipitación anual de 396 mm, distribuida el 83 % en los meses de junio a octubre y un 13 % de noviembre a marzo (CONAGUA, 2020). El suelo en el área experimental es de tipo vertisol, con un contenido de arcilla mayor al 50 % (Borbón *et al*., 2020).

Tratamientos y diseño experimental

Las rotaciones de trigo y maíz después de cártamo y el monocultivo de cártamo se establecieron en LC, mientras que en LT solo se utilizó el monocultivo de cártamo por ser este el sistema tradicional empleado en la región. Las rotaciones entre cultivos se alternaron durante tres ciclos de producción (Tabla 1). Se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial y cuatro repeticiones por tratamiento. La parcela experimental fue de ocho surcos de 100 m de longitud, con una separación entre surcos de 0.8 m. La parcela útil fueron dos surcos centrales de 5 m de longitud (8 m^2). Los tratamientos con monocultivo, tanto en LT como en LC, permanecieron en la misma parcela. Las rotaciones en LC cambiaron de ubicación de acuerdo al diseño establecido (Tabla 1).

Tabla 1. Rotaciones de cártamo con maíz y trigo en sistemas de LC, comparados con el monocultivo de cártamo en LC y LT.
Table 1. Safflower rotations with corn and wheat in TC systems, compared to safflower monocultive in TC and CT.

Trat.	SL	¹Ciclos de producción		
		2018-2019	**2019-2020**	**2020-2021**
1	LC	**Cártamo** / trigo	**Trigo** / cártamo	**Cártamo** / trigo
2		**Cártamo** / maíz	**Maíz** / cártamo	**Cártamo** / maíz
3		**Cártamo** / cártamo	**Cártamo** / cártamo	**Cártamo** / cártamo
4	LT	**Cártamo** / cártamo	**Cártamo** / cártamo	**Cártamo** / cártamo

Negritas indica el cultivo estudiado. Trat.: tratamientos, SL: sistema de labranza, LC: labranza conservación, LT: labranza tradicional.

Manejo agronómico

El sistema de LT se estableció en un terreno cuya preparación es convencional de manera permanente, la cual se trabaja con cincel, se rastrea e incorpora el rastrojo cada ciclo. La LC se realizó en un suelo donde los últimos diez años la siembra se realiza sin previo laboreo y se deja el total del rastrojo de los diferentes cultivos en rotación o monocultivo sobre la superficie del suelo. En LT el laboreo en cada ciclo consistió en un paso de cincel de tres picos a una profundidad de 50 cm, dos pasos de rastra con un equipo de 28 discos (John Deere®) a 20 cm de profundidad, nivelación y surcado.

El estudio se implementó desde el ciclo otoño-invierno 2010-2011, pero los componentes de rendimiento se evaluaron en los ciclos otoño-invierno 2019-2020 y 2020-2021, en todo el terreno experimental hubo un periodo de descanso durante los meses de verano y se mantuvo libre de maleza durante dicho tiempo, con el uso del herbicida glifosato (FAENA® FUERTE 360), el cual se aplicó en dosis de 3 L ha^{-1}, con un aspersor de 12 boquillas (Swissmex®) propulsada por un tractor, con un gasto de agua de 250 L ha^{-1}.

La variedad de cártamo utilizada fue SEMAY OL, ésta fue liberada por INIFAP y es la de mayor uso en el sur de Sonora. La siembra se realizó con una sembradora de precisión (Monosem®), fue en húmedo después del riego de presiembra, a hilera sencilla y en surcos con 80 cm de separación. La densidad de siembra fue de 16 semillas por metro lineal, alrededor de ocho kg de semilla ha^{-1}.

La aplicación del riego durante el ciclo otoño-invierno 2019-2020 fue en la etapa de inicio de ramificación, formación de botones florales y durante el inicio de floración, mientras que en el ciclo otoño-invierno 2020-2021 solo se aplicó un riego de auxilio en la etapa de inicio de ramificación, en ambos ciclos se utilizó el sistema de riego por gravedad, con sifones de aluminio de una pulgada. La fertilización fue con la fórmula 149-52-00 kg ha^{-1} (N-P-K), en presiembra se aplicó el total del P y la mitad del N y el resto de la dosis se suministró antes del primer riego de auxilio. El fertilizante se depositó en banda a un costado de la hilera de plantas, con una sembradora triguera de cuatro surcos, a la cual se le adaptaron discos cortadores corrugados en la parte frontal. La fuente

de N fue Urea (46-00-00) y la de P fue fosfato monoamónico (11-52-00).

El combate de malezas en LC fue con una aplicación de 3 L ha^{-1} del herbicida glifosato (FAENA® FUERTE 360) antes de la siembra, donde se eliminó todo tipo de maleza que germinó con el riego de presiembra, mientras que en LT esta primera generación de malezas se combatió al momento de dar tierra con un equipo cultivador; en postemergencia al cultivo fue necesario realizar otra aplicación de herbicida para el control de maleza de hoja ancha en todos los tratamientos, para lo cual se utilizó metsulfuron metil + thifensulfuron metil (15 g ha^{-1}). La aplicación del herbicida fue alrededor de los 35 días después de la siembra (DDS) en los cuatro tratamientos y durante los dos ciclos de evaluación, con un gasto de agua de 250 L ha^{-1}. El combate de plagas y de enfermedades no fue innecesario.

Variables evaluadas

La altura de planta (cm) se midió previo al momento de la cosecha del grano, para lo cual se utilizó un flexómetro, se consideró desde la base del suelo hasta los capítulos más altos de la planta. El número de plantas cosechadas m^{-2} se registró mediante conteo y se obtuvo el diámetro del tallo con el uso de un vernier graduado en cm.

El número de capítulos m^{-2} se obtuvo mediante el registro de éstos en 1.25 m lineales de un surco cuya competencia era completa. La obtención de las muestras de capítulos se realizó cuando el cultivo ya estaba en madurez de cosecha (alrededor del 8 % de humedad en el grano), éstas se colectaron en forma manual.

El peso de grano por capítulo se obtuvo mediante el cociente entre el peso del grano obtenido y el número total de capítulos m^{-2}, así también el número de granos por capítulo se obtuvo con una regla de tres entre el peso de mil granos y el peso total de la muestra, obteniendo el total de granos m^{-2} y posteriormente dividiéndolos entre el número de capítulos, como el procedimiento realizado por Olivo *et al*. (2020).

El peso de mil granos (g) se calculó al contabilizar 1000 granos de muestra compuesta obtenida al azar del grano cosechado y la obtención de su peso con una báscula digital.

El rendimiento de grano (kg ha^{-1}) se obtuvo mediante la cosecha de dos surcos con competencia completa de cinco metros de longitud (8 m^2), la cosecha fue manual y la trilla se realizó con cosechadora mecánica. El rendimiento se ajustó al 8 % de humedad en el grano, el peso hectolítrico (PHE, kg hL^{-1}) se estimó mediante el peso de un litro de grano.

Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza para las variables evaluadas, donde los factores de variación fueron los ciclos y las rotaciones en LC vs LT, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson entre el rendimiento, capítulos por m^2, número de granos por capítulo, peso de 1000 granos y peso hectolítrico. Para los cálculos se usó el paquete estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de grano de cártamo

El mayor rendimiento se obtuvo con las rotaciones cártamo después de trigo y cártamo después de maíz en LC, mientras que el rendimiento más bajo lo presentó el tratamiento de cártamo después de cártamo en LC ($P \leq 0.05$), el cual fue similar a cártamo en LT (Tabla 2). Comparable a lo reportado por Borbón *et al*. (2020), quienes mencionan que el monocultivo de cártamo en LC afecta el rendimiento de este cultivo, a su vez encontraron un mayor rendimiento de cártamo cuando éste se siembra en LC pero con rotación de cultivos. Mientras que Küçük y Akbolat (2018) no encontraron diferencias en rendimiento de grano de cártamo entre LT, agricultura reducida y siembra directa en trabajos realizados en una provincia de Turquía. Larson *et al*. (2021) compararon el sistema de LC vs LT y mencionan que los rendimientos de cártamo no fueron más altos al utilizar el barbecho.

Tabla 2. Componentes de rendimiento de cártamo evaluado en LC con rotación de cultivos comparado con cártamo en LT durante los ciclos otoño-invierno 2019-2020 y 2020-2021.
Table 2. Safflower yield components evaluated in TC with crop rotation compared to safflower in CT, during the 2019-2020 and 2020-2021 fall-winter cycles.

Rotación y SL	Rendimiento (kg ha^{-1})	PMG (g)	# capítulos m^{-2}	Peso (g) de granos $capítulo^{-1}$	# granos $capítulo^{-1}$
Cártamo/trigo LC	1952 a	31.97	287.75 ab	0.66 a	22.80 ab
Cártamo/maíz LC	2077 a	31.12	307.88 a	0.70 a	22.57 a
Cártamo/cártamo LC	1014 b	30.20	248.25 b	0.46 b	15.20 b
Cártamo/cártamo LT	1287 b	31.52	281.38 ab	0.48 b	15.42 b
C.V.	12.48	4.13	14.82	22.04	21.76
DMS	275.31	NS	58.12	0.17	5.61

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). SL= sistema de labranza; LC= labranza de conservación; LT= labranza tradicional; PMG= peso de mil granos; CV= coeficiente de variación; DMS= diferencia mínima significativa.

úmero de capítulos por m²

El número de capítulos m^{-2} fue diferente entre las rotaciones. La rotación cártamo después de maíz en LC tuvo el mayor número de capítulos por unidad de superficie ($P \leq 0.05$), aunque con diferencia solo con el monocultivo en el sistema de LC, pero este último fue similar a los tratamientos de cártamo después de trigo en LC y cártamo en LT (Tabla 2). Esta variable mostró una asociación positiva ($r= 0.46$, $P \leq 0.01$) con el rendimiento de grano, por lo cual se le considera el principal componente de rendimiento en el cultivo de cártamo (Singh *et al*., 2016). Este mismo componente presentó una correlación negativa con el peso de 1000 granos ($r = -0.0059$, $P \leq 0.01$) y con el peso hectolítrico ($r = -0.15$, $P \leq 0.01$).

Granos y su peso por capítulo

El número de granos y el peso de los mismos por capítulo presentaron diferencias entre las rotaciones en ambos sistemas de labranza ($P \leq 0.05$), la LC con rotación de cultivos mostró un mayor promedio en ambos componentes de rendimiento (Tabla 2). La asociación entre el peso del grano y el número de capítulos fue negativa aunque no significativa, lo anterior se debe a que dicha relación es una respuesta fisiológica compensatoria provocada por la competencia por los fotosintatos que también se presenta en diversos cultivos (Rebetzke *et al*., 2016; Sayama *et al*., 2017). El número de granos por capítulo también se correlacionó de manera positiva ($r = 0.73$, $P \leq 0.01$) con el rendimiento de grano, lo cual coincide con Hussain *et al*. (2014), quienes señalan que existe una asociación positiva entre dichas variables.

Peso de 1000 granos

La rotación no presentó efecto en el peso de 1000 granos, dichos valores fueron desde 30.2 hasta 31.97 g, en la variedad Promesa el peso promedio de 1000 granos es de 43 g, ya que esta variable es afectada por el ambiente y el genotipo (Valadez y Cervantes, 2017); sin embargo, este componente de rendimiento se asoció de manera positiva con el peso de grano por capítulo y con el rendimiento de grano, similar a lo que reportan Hussain *et al*. (2014).

Plantas por m²

El número de plantas m^{-2} fue similar entre las rotaciones en ambos sistemas de labranza, lo cual difiere con lo que reportan Küçük y Akbolat (2018), quienes señalan un mayor porcentaje de plantas emergidas por m^2 en favor del sistema de LT. El diámetro de tallo tampoco mostró diferencia entre tratamientos (Tabla 3). El número de plantas m^{-2} presentó una asociación negativa con el diámetro de tallo ($r = -0.78$, $P \leq 0.01$), esta es una respuesta observada en muchos cultivos ocasionada por el incremento de la densidad de plantas y atribuida a una reducción de la penetración de la luz al interior del dosel (Raei *et al*., 2014).

Peso hectolítrico y altura de planta

La rotación de cártamo después de maíz presentó mayor peso hectolítrico en comparación con el monocultivo en ambos sistemas de labranza ($P \leq 0.05$), la siembra de cártamo después de trigo en LC mostró un peso hectolítrico similar a la rotación con maíz y sin diferencia con cártamo en monocultivo (Tabla 3). El peso hectolítrico presenta una baja asociación ($r = 0.21$) con el rendimiento de grano y sin significancia, lo cual difiere con Raju *et al.* (2019), quienes señalan una correlación positiva significativa ($r = 0.399$, $P \leq 0.01$).

La altura de planta fue menor en el monocultivo establecido en LC, aunque con diferencia solo con su homólogo en el sistema de LT ($P \leq 0.05$), mientras que cártamo con rotación de maíz y con trigo presentaron altura similar con ambas condiciones en monocultivo (Tabla 3). La diferencia observada entre el sistema de LT y la LC de cártamo difiere con lo reportado por Küçük y Akbolat (2018), quienes señalan que la altura de planta es similar entre sistemas de labranza.

Tabla 3. Componentes de rendimiento de cártamo evaluado en AC con rotación de cultivos comparado con cártamo en LT durante los ciclos otoño-invierno 2019-2020 y 2020-2021.

Table 3. Safflower yield components evaluated in TC with crop rotation compared to safflower in CT, during the 2019-2020 and 2020-2021 fall-winter cycles.

Rotación y SL	PHE (kg hL^{-1})	Altura de planta (cm)	# plantas m^{-2}	Diámetro del tallo (cm)
Cártamo/trigo en LC	0.54 ab	145.87 ab	17.50 a	1.01 a
Cártamo/maíz en LC	0.55 a	143.50 ab	13.75 a	1.06 a
Cártamo/cártamo en LC	0.51 b	139.50 b	18.00 a	0.89 a
Cártamo/cártamo en LT	0.51 b	146.75 a	19.00 a	0.84 a
C.V.	3.99	3.34	18.17	14.31
DMS	0.029	6.71	6.84	0.30

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). LC= siembra directa; LT= labranza tradicional; PHE= peso hectolítrico; CV= coeficiente de variación; DMS= diferencia mínima significativa.

CONCLUSIONES

El sistema de labranza en combinación con la rotación de cultivos presenta influencia sobre el número de capítulos, en el número y el peso de granos de los capítulos, asimismo sobre el peso hectolítrico del grano de cártamo. El uso de la rotación de cultivos en el sistema de LC permite incrementar el rendimiento de esta oleaginosa. El sistema de labranza por sí solo no es suficiente para disminuir el efecto negativo que tiene el monocultivo sobre el rendimiento del grano de cártamo.

REFERENCIAS

Aguilera, M.N.A., Hernández, J.A., Montoya, C.L., Aguirre, U.L.A., Cerna, C.E. y Landeros, F.J. 2021. Comportamiento de líneas élite de cártamo de alta productividad y calidad de aceite en el Valle del Yaqui, Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 12(3): 421-432.

Ávila, C.E., Ochoa, E.X.M., Montoya, C.L.M., Aguilera, N.A., Borbón, G.A. y Padilla, P.J.I. 2017. Chey-ol: nueva variedad de cártamo oleica para el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 8(5): 1209-1212.

Bishwoyog, B., Sukhbir, S., Sangamesh, V.A., Sultan, B., Rupinder, S. y Dick, A. 2020. Spring safflower water use patterns in response to preseason and in-season irrigation applications. ELSEVIER 228(1): 0378-3774. doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105876.

Borbón, G.A., Lugo, G.G.A., Reyes, O.A., Valenzuela, H.V. y Sauceda, A.C.P. 2020. Rotación de trigo, maíz y cártamo en labranza de conservación *vs*. labranza tradicional. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 43(4): 371-378. doi.org/10.35196/rfm.2020.4.371.

Borbón, G.A., Montoya, C.L., Ochoa, E.X.M., Aguilera, M.N.A., Ávila, C.E. y Cota, B.C.I. 2019. SEMAY OL, Nueva variedad de cártamo oleica. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 42(1): 83-85. doi:10.35196/rfm.2019.1.83-85.

CONAGUA, Comisión Nacional del Agua, 2020. Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia. Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua. Ciudad de México. Disponible en: https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias.

CONAGUA, Comisión Nacional del Agua, 2024. Monitor de Sequía en México. Disponible en: https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/monitor-de-sequia/monitor-de-sequia-en-mexico

da Silva, C.J., da Silva, A.C., Zoz, T., Toppa, E.V.B., Silva P.B. y Zanotto, M.D. 2015. Genetic divergence among accessions of *Carthamus tinctorius* L. by morphoagronomic traits. *African Journal of Agricultural Research*. 10(52): 4825-4830. doi: 10.5897/AJAR2015.9859.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2021. Producción mundial de cultivos. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL.

FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2018. Sistema de costos agrícolas. Resumen de costos. Disponible en: https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/TemasUsuario.jsp.

Hussain, T., Tariq, M.A., Ahmad, I., Saghir, M., Batool, M., Safdar, M., Sher A. y Tariq, M. 2014. Characters association analysis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4(6): 63-65.

Küçük, H. y Akbolat, D. 2018. Investigation of different tillage and seeding methods in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivation. *Scientific Papers Series A. Agronomy.* 61(1): 481-486.

Larson, C.D., Menalled, F.D., Lehnhoff, E.A. y Seipel, T. 2021. Plant community responses to integrating livestock into a reduced-till organic cropping system. *Ecosphere*. 12(3): 1-15. doi.org/e03412.10.1002./ecs23412.

Olivo, M., Bassegio, D. y Zanotto, M.D. 2020. Combining ability and heterosis in a diallel cross of safflower under brazilian tropical conditions. Agronomy Journal. 112: 1580-1588. doi:10.1002/agj2.20151

Raei, Y., Garebagh, F.P. y Weisany, W. 2014. Effects of plant density and sowing date on some quantitative and qualitative characteristics of forage sorghum as second cropping. *Advances in Bio Research*. 5(2): 114-118. doi:10.15515/abr.0976-4585.5.2.114118.

Raju, T.J., Sultana, R., Palchamy K. y Keshavulu, K. 2019. Study on relationships among seed yield components in in F3:4 population in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(1): 2205-2207.

Rebetzke, G.J., Bonnett, D.G. y Reynolds, M.P. 2016. Awns reduce grain number to increase grain size and harvestable yield in irrigated and rainfed spring wheat. *Journal of Experimental Botany*. 67(9): 2573-2586. doi.org/10.1093/jxb/erw081.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA. 8621 p.

Sayama, T., Tanabata, T., Saruta, M., Yamada, T., Anai, T., Kaga, A. y Ishimoto, M. 2017. Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the Ln gene in induced soybean mutants. *Breeding Science*. 67(4): 363-369.

SIAP, Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), Sonora, México. Disponible en: http://www.siap.gob.mx.

SIAP-SIACON-NG, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta-Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2020. Disponible en: .

Singh, S., Angadi, S.V., Hilaire, R.S., Grover, K. y VanLeeuwen, D.M. 2016. Spring safflower performance under growth stage based irrigation in the southern high plains. *Crop Science*. 56(4): 1878-1889. doi.org/10.2135/cropsci2015.08.0481.

Sirel, Z. y Aytaç, Z. 2016. Relationships between the seed yield and some agronomic characteristics of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under semi-arid conditions. *Turkish Journal of Field Crops*. 21(1): 29-35. DOI:10.17557/tjfc.50988.

Hussain, M.I., Lyra, D.A., Farooq, M., Nikoloudakis, N. y Khalid, N. 2015. Salt and drought stresses in safflower: a review. Agronomy for Sustainable Development. 36(1). doi:10.1007/s13593-015-0344-8

Valadez, G.J. y Cervantes, M.J.E. 2017. Promesa, variedad de polinización libre de cártamo para la región de las huastecas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 40(1): 103-105. doi:10.35196/rfm.2017.1.103-105.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) meat added with gelatin and microbial transglutaminase

Propiedades de gelificación de carne de jaiba (*Callinectes sapidus*) adicionada con gelatina y transglutaminasa microbiana

Edgar Alan Cortés Morales[1], Miguel Ángel Martínez Maldonado[2], Eduardo Morales Sánchez[1], Rocío M. Uresti Marín[3], José Alberto Ramírez de León[3], Gonzalo Velazquez[1]*

[1] Instituto Politecnico Nacional. CICATA-IPN Unidad Querétaro.
[2] Tecnológico Nacional de México/ ITS Huichapán.
[3] Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica de Trabajo Social y Ciencias para las Humanidades.

RESUMEN

Las proteínas de la carne de cangrejo generalmente se separan de su caparazón después de la cocción, lo que implica una agregación térmica tipo coágulo, que induce problemas relacionados con su capacidad de retención de agua, lo que limita sus alternativas de procesamiento posteriores. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adición de gelatina y transglutaminasa microbiana (MTgasa) sobre las propiedades de geles obtenidos de carne de jaiba azul (*Callinectes sapidus*) previamente cocida. La carne de jaiba que se sometió a 3 ciclos de lavado-prensado con agua fría, utilizando una relación 3:1 agua-carne y se mezcló con 0 a 3 % de gelatina y 0.5 % de MTgasa, se embutió en tubos de acero inoxidable y se cocieron a 90 ºC durante 15 min en agua caliente. Se determinaron las propiedades mecánicas (análisis del perfil de textura, módulo de Young y tensión máxima), color, agua extraíble e imágenes micrográficas (SEM). Los resultados mostraron que la gelatina interaccionó con las proteínas de la carne de jaiba y la MTgasa utilizó ambas proteínas como sustrato para formar una red estructurada. Las propiedades mecánicas del gel dependieron del nivel de gelatina añadido, con mejores resultados a menor cantidad. La cantidad de agua extraible se redujo mediante la adición de 3 % de gelatina.

Palabras clave: carne de jaiba, gelatina, transglutaminasa microbiana proteína muscular, gelificación.

ABSTRACT

Crab meat proteins are usually separated from shells after cooking, which induces a thermal coagulum-type aggregation affecting the water-holding capacity and limiting further processing alternatives. This study aimed to evaluate the effect of adding gelatin and microbial transglutaminase (MTgase) on the properties of gels obtained from cooked blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. Crab meat was subjected to 3 washing-pressing cycles with cold water using a 3:1 (water:meat) ratio, mixed with 0 to 3 % gelatin and 0.5 % MTgase, stuffed into stainless steel tubes, and cooked by immersing in hot water at 90 ºC for 15 min. Mechanical properties (texture profile analysis, Young modulus, and maximum stress), color, extractable water, and micrograph images (SEM) were obtained. Results showed that gelatin interacted with crab proteins, and MTgase used both proteins as substrates to form a structured network. The mechanical properties of gels depended on the level of gelatin added, with better results at a lower amount. The amount of extracted water was reduced by adding 3 % of gelatin.

Keywords: crab meat, gelatin, microbial transglutaminase, muscle protein, gelation.

INTRODUCTION

Muscle protein gelling is a widely used technological process for developing different meat, poultry, and fish products. Different conditions used in the process, such as temperature, pH, salt level, or additives, allow modifying the functional properties of the final products to develop or improve quality parameters like texture, color, flavor, or stability (Ramírez *et al*., 2011).

Solubilization with salt and thermal denaturalization (unfolding) of the non-cooked muscle protein are required to form gel products (Uresti *et al*., 2005; Castro-Briones *et al*., 2009). However, meat extracted from crabs cannot follow such steps since these organisms are processed by high thermal treatment, inducing the denaturation and aggregation of proteins before being separated from the shell (Martínez *et al*., 2014). These steps hinder any further processing alternative for this important and abundant natural resource, with particular interest in the blue crab (*Callinectes sapidus*) of the Gulf of Mexico (Rodríguez-Castro *et al*., 2017; Morales-Azpetia *et al*., 2021), different than canning (Bouriga *et al*., 2023) or freezing (Ghribi *et al*., 2023) both with highly appreciated market for consumers. Different processes have been explored to solve this situation.

Baxter and Skonberg (2006) reported that cooked meat from Johan crab (*Cancer borealis*) could form gels using a 2-cycles washing-dewatering process, similar to the widely used technique to obtain surimi products. Similar behavior, but with weak gels, was obtained when cooked crab meat was centrifugated to remove the water-soluble protein fraction (tropomyosin being the most abundant extracted protein) (Baxter and Skonberg, 2008). Other processing techniques have been reported, such as a different cooking

*Author for correspondence: Gonzalo Velazquez
e-mail: gvelazquezd@ipn.mx
Received: April 23, 2024
Accepted: June 23, 2024
Published: August 13, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2316

temperatures of crab meat in the range of 50 to 120 °C, with better mechanical properties in gels obtained at higher precooking temperature (Martínez *et al*., 2014). microbial transglutaminase (MTgase) at 0.5 or 1.0 % has been reported as an alternative to reduce the washing-dewatered pressing cycles to just one, which still affects the characteristic flavor of the crab by removing the water-soluble fraction of meat (Hernández-Robledo *et al*., 2015; 2017). Gels with appropriate texture from cooked crab meat without removing the water-soluble fraction were obtained by mixing crab meat with MTgase at 60 °C (Trejo-Díaz *et al*., 2021). However, all these methods using thermally induced gelling of crab meat result in gels with poor water holding capacity.

The objective of this work was to determine if gelatin combined with MTgase can improve the water holding capacity of cooked crab meat proteins without affecting the mechanical properties of the gels.

MATERIAL AND METHODS

Raw material

The blue crab *(Callinectes sapidus)* was captured in Laguna Madre, Tamaulipas, transported, and processed at the facilities of the company "Integradora Pesquera Acuícola" located in San Fernando, Tamaulipas (México) within 24 h after caught. The crabs were cooked using a commercial autoclave and cooled with clean water. The crab meat was removed from shells, introduced into a plastic recipient, and transported on ice to the laboratory for further analysis.

Additives

Gelatin (GP 28, 290 bloom, Coloidales Duché, S.A DE CV. Ciudad de México, México) was purchased at a local market. The commercial microbial transglutaminase was Active TG-TI (Ajinomoto USA, Inc., Teaneck, NJ).

Meat processing

Cooked and minced crab meat was washed with water at a 3:1 (water: meat) ratio for 10 min at 4 °C to dissolve soluble proteins, drained with a cotton fabric filter to remove the excess water containing the soluble compounds and stored in 250 g portions in polyethylene bags until analyzed.

Preparation of gels

Following the methodology reported by Hernández-Robledo *et al*. (2017), the meat was mixed with gelatin (0, 0.5, 1, or 3 %) and MTgase (at 0 % as control or 0.5 %) using a food processor (Hamilton Beach Model 72860-MX, Glen Allen, VA, USA) for 3 min and stuffed into stainless steel tubes with cap in both extremes, closed, and immersed in hot water at 90 °C for 30 min in a water bath with temperature control (Techne Tempette Junior TE-8J). After cooking, the tubes were immersed in ice water (0 °C) and stored at 4 °C until analyzed (less than 16 h).

Mechanical properties

A texturometer (Model TA Plus, Lloyd Instruments, Ametek, UK) was used to perform the uniaxial compression test. Cylindrical gel samples (25 x 30 mm) were compressed to 75 % at 1 mm/s crosshead speed using a 50 mm aluminum probe (P50). The test was carried out at room temperature. Two compression cycles were used for texture profile analysis (TPA). The hardness, cohesiveness, springiness, and chewiness parameters were calculated from the TPA curves. From the first compression cycle, stress-strain plots were obtained, and the Young modulus and maximum stress were calculated. Six replicates were analyzed for each treatment.

Colorimetry

The L*, a*, b* CIELab color parameters of the samples were determined using a colorimeter (Bluemetric, model BLUE-HP200, SA de CV, Monterrey, Mexico) in four random points on each gel sample. From the measurements, a*, b*, L*, and the color attributes Hue* and Chroma* were calculated.

Expressible water

A 3 g sample from the crab meat gels was wrapped in 5 paper sheets of 6 cm x 6 cm, placed in 50 mL conical centrifuge tubes, and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min (Rotofix 32 A. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) following the methodology reported by Hernández-Robledo *et al*. (2017). Subsequently, the final weight of the sample was registered. Four repetitions per treatment were performed. The EW was calculated using Equation 1.

$$EW = (Wi-Wf /Wi) \times 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

Where:
EW = amount of extracted water.
Wi = Initial weight.
Wf = Final weight.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The crab meat gels were freeze-dried and ground. A sample was fixed on an aluminum pin using conductive double-sided tape and then observed in an ambient scanning electron microscope (Phenom Pro., Phenom-World BV, Eindhoven, The Netherlands).

Experimental design and analysis

Data were analyzed using a factorial ANOVA and the post hoc Tukey test was performed to evaluate the significant effects of the treatments. Results are presented as mean ± standard deviation, and differences were considered statistically significant at a $p < 0.05$. Also, multiple regression analysis was performed to model the response of the gel properties as a function of the percentage of gelatin and MTgase using a second-order polynomial equation (Design Expert® v10, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Coefficients of the terms in the polynomial equation were calculated and 3D plots were used to describe the behavior of the analyzed properties.

Table 1. Experimental design.

Factors	Levels
Gelatin concentration	0, 0.5, 1 and 3 %
MTgase concentration	0 % and 0.5 %

RESULTS AND DISCUSSION

The heating process allowed gelling the crab meat despite meat proteins were previously denatured and aggregated due to the processing conditions required to separate of the meat from the shell.

Regression analysis

The correlation values obtained from the multiple regression analysis are shown in Table 2. Hardness, cohesiveness, and chewiness showed R^2 and adjusted R^2 values higher than 0.9, indicating that the model fits adequately to data and that the model could be appropriate for future data.

Young modulus maximum stress, and expressible water fitted appropriately to the model ($R^2 > 0.9$). The differences between R^2 and adjusted R^2 values are lower than 0.2 indicating that the terms included in the polynomial models allow describing the effect of the parameters on these properties.

The model obtained for springiness did not fit well at any of both parameters, indicating that his property was not a good indicator to observe changes in mechanical properties after adding gelatin. Springiness is not the same as elasticity, because this test may involve the fracture of the sample affecting its capacity to return to its original form (Rahman *et al*., 2021). Young modulus, on the other hand, is associated with elasticity because it considers the compression values (stress and strain) involved in the linear region of the test implying only a small deformation (Lam *et al*., 2017) that does not fracture (macro or micro) the sample, thus its deformation theoretically is reversible and the sample should return to its original shape.

The analysis of variance (ANOVA) for the fitting of the gelatin and MTgase effect on mechanical and extractable water is shown in Table 3. Models differ significantly (at $p < 0.05$) for changes induced in hardness, cohesiveness, chewiness, Young modulus, and maximum stress. Gelatin significantly affected these parameter ($p < 0.05$) except for expressible water. However, MTgase did not affect any parameter, and there was no significant effect on the interaction of gelatin and MTgase on any studied property. The quadratic term (A^2) suggests that gelatin had a higher effect on the mechanical properties than in expressible water.

Mechanical properties

Figure 1 shows the changes in the texture profile analysis parameter. The hardness of gels was not affected by the MTgase level (0 to 0.5 %); however, it was negatively affected by the addition of low levels of gelatin (less than 2 % as calculated for the model). Gelatin added at 3 % improved the hardness

Table 2. Coefficients of the regression model for hardness (N), cohesiveness, springiness, chewiness (N), Young modulus (MPa), maximum stress (MPa) and expressible water, of gels from crab meat added with gelatin and MTgase.

Factor	Hardness (N)	Cohesiveness	Springiness	Chewiness (N)	Young modulus (MPa)	Maximum stress (MPa)	EW (%)
				Gelatin			
Intercept	11.77	0.2169	0.7402	0.6142	78.93	17.9	11.72
A-Gelatin	-8.19	-0.0788	-0.0022	-4.14	36.9	9.06	-9.47
B-MTgase	3.39	-0.0059	0.0144	0.7807	7.93	1.2	1.96
AB	-2.56	-0.0163	0.0031	-1.11	4.65	2.55	0.2864
A^2	26.46	0.1092	-0.0122	8.97	4.52	10.49	10.36
R^2	0.9595	0.9658	0.435	0.9595	0.9356	0.9499	0.8933
Adjusted R^2	0.9055	0.9203	-0.3183	0.9055	0.8497	0.8832	0.7511

Table 3. Statistical significance (p-value) for hardness, cohesiveness, springiness, chewiness, Young modulus, maximum stress, and expressible water of gels from crab meat added with gelatin and MTgase obtained from the ANOVA of the regression model.

Factor	Hardness (N)	Cohesiveness	Springiness	Chewiness (N)	Young modulus (MPa)	Maximum stress (MPa)	EW (%)
				Gelatin			
Model	0.0199*	0.0155*	0.7018	0.0199*	0.0393*	0.0272*	0.0815
A-Gelatin	0.0206*	0.0037*	0.881	0.0089*	0.0091*	0.0116*	0.0187*
B-MTgase	0.0946	0.4810	0.2551	0.2333	0.1908	0.4133	0.3009
AB	0.2420	0.1753	0.8265	0.1904	0.4871	0.2045	0.8933
A^2	0.0054*	0.0106*	0.6784	0.0071*	0.7356	0.0491*	0.0843

*Indicates statistical significance.

of gels, but it was not enough to recover the initial parameters of samples obtained without this hydrocolloid (Figure 1A).

Cohesiveness (Figure 1B) and chewiness (Figure 1D) showed a similar behavior to hardness, with an initial decrease as affected by the addition of 2 % gelatin and a slight increase when added at 3 %. As mentioned previously, when modeling was discussed, an interaction between MTgase and gelatin was not observed. Crab gels showed relatively high values of springiness (72 %), and this parameter was not affected by the addition of MTgase, gelatin, or their combination (Figure 1C).

Small changes in mechanical properties of crab meat gels, when 0.6 % MTgase was added and cooked directly at 90 °C (by immersion in hot water), were reported previously. However, better mechanical properties were found when gels from crab meat containing MTgase were incubated at 40 °C for 30 min. This behavior was associated with side-to-side protein aggregations promoted by covalent bondings of adjacent proteins as a result of MTgase activity during incubation at 40 °C (Martínez *et al*., 2014).

The disruptive effect of gelatin on the mechanical properties was also observed in gels obtained from Alaska pollock surimi (Hernández-Briones *et al*., 2009).

Young modulus (Figure 2A) and maximum stress (Figure 2B) showed a different behavior than TPA parameters. These mechanical properties increased when both MTgase and gelatin were added, and showed a combined effect when added at their maximum level (0.5 % and 3 %, respectively). Differences between both mechanical parameters are associated with the basis of each test. TPA simulates the textural perception in the mouth while a meal is being chewed, while Young modulus and maximum stress, as mentioned previously, are fundamental tests (Rahman *et al*., 2021).

Expressible water

The percentage of water extracted was reduced by 20 % by adding up to 1.5 % gelatin (Figure 3). Gelatin is a hydrocolloid that is characterized by the ability to trap water, which can help crab meat gel to improve its water-holding capacity

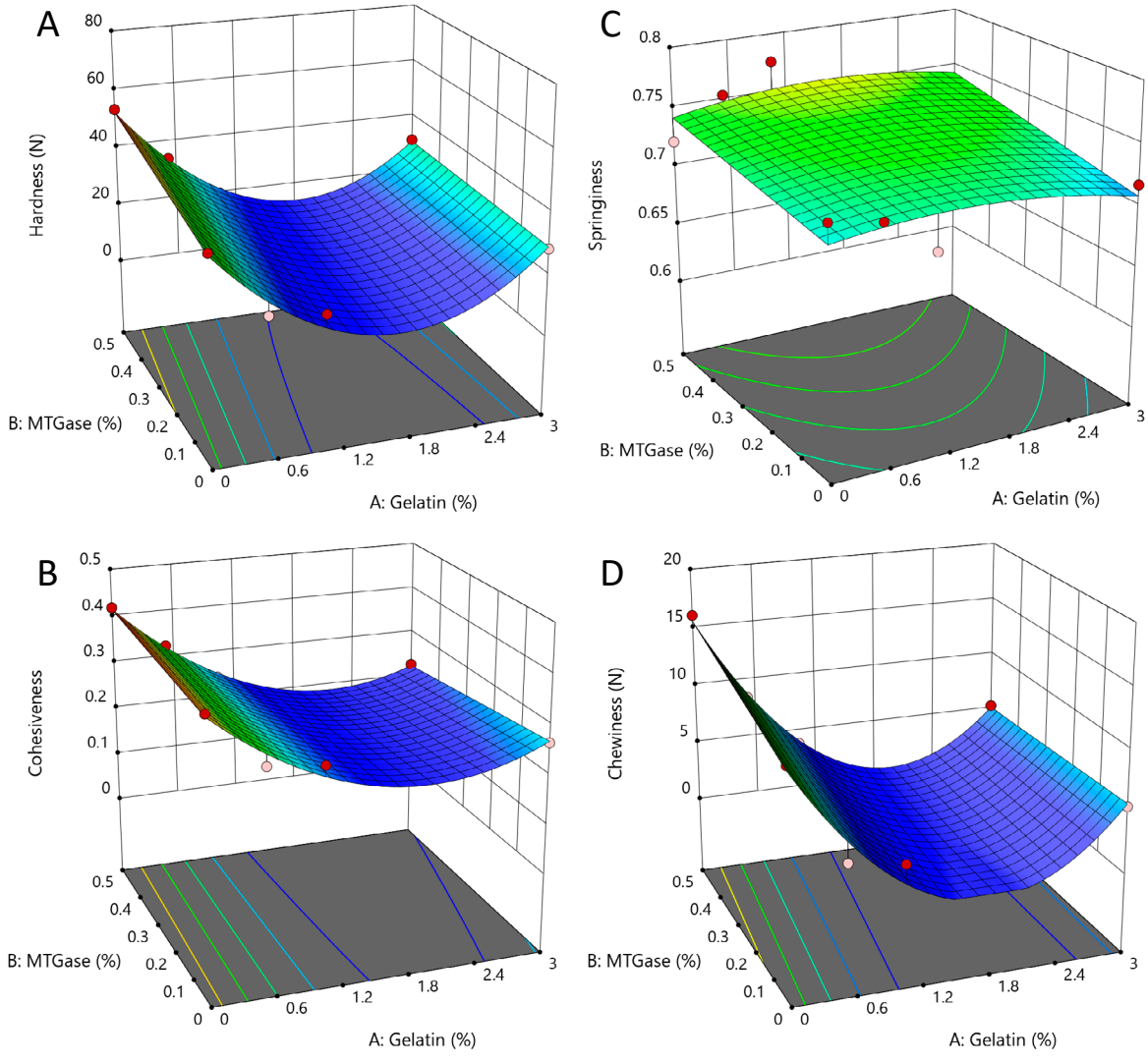


Figure 1. Effect of MTgase and gelatin on the TPA parameter values of crab meat gels.

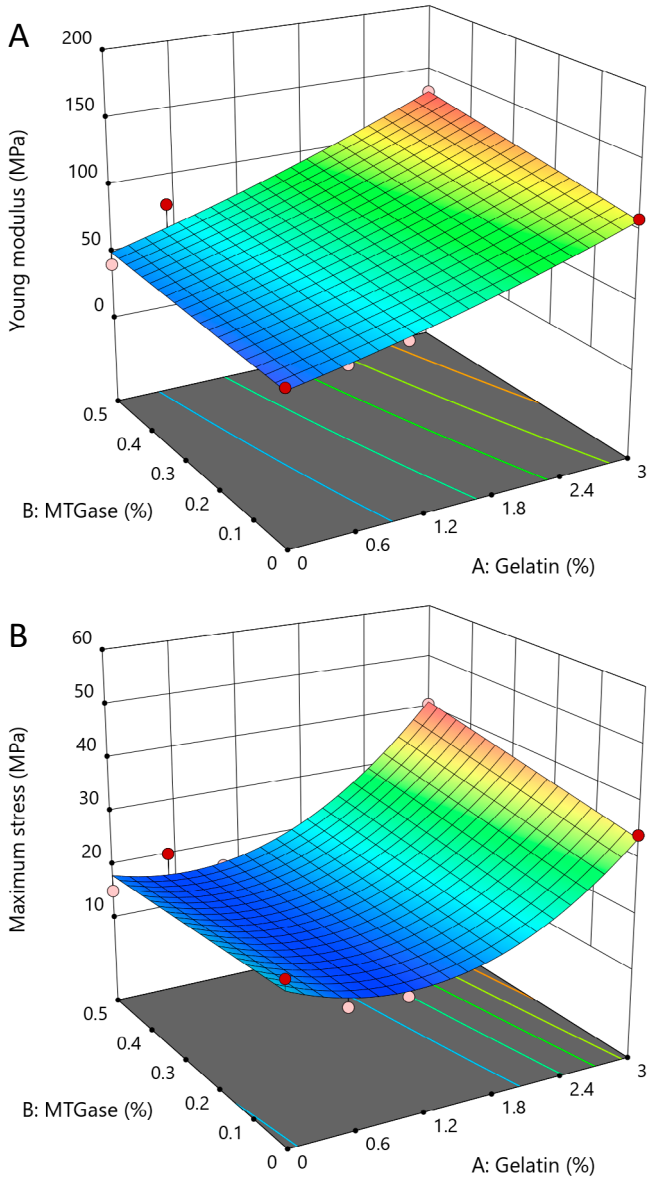


Figure 2. Effect of MTgase and gelatin on Young modulus (A) and maximum stress (B) of crab meat gels.

and thus, decrease the amount of water it can lose. However, previous studies (Martinez *et al*., 2014) with blue crab meat gels, the addition of transglutaminase (6 g/kg), incubated at 40 °C and cooked at 90 °C, showed lower percentages of water extracted than gels without enzyme. In this study, adding MTgase did not affect the amount of extracted water alone or combined with gelatin, even though gelatin also acts as a substrate for the enzyme (Haug *et al*., 2004). Studies on adding MTgase and gelatin to surimi gels reported a decrease in water loss (Hernández-Briones *et al*., 2009; Kaewudom *et al*., 2013).

Color attributes

The effect of gelatin addition on color attributes of crab meat gels is shown in Table 4. No significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in these parameters as a function of the level of gelatin or MTgase, indicating that, regardless of the concentration of gelatin or the enzyme, the gels had similar color attributes. Gelatin is a translucent food additive (Siccha and Lock, 1992) and therefore, adding this protein does not affect the color of gels.

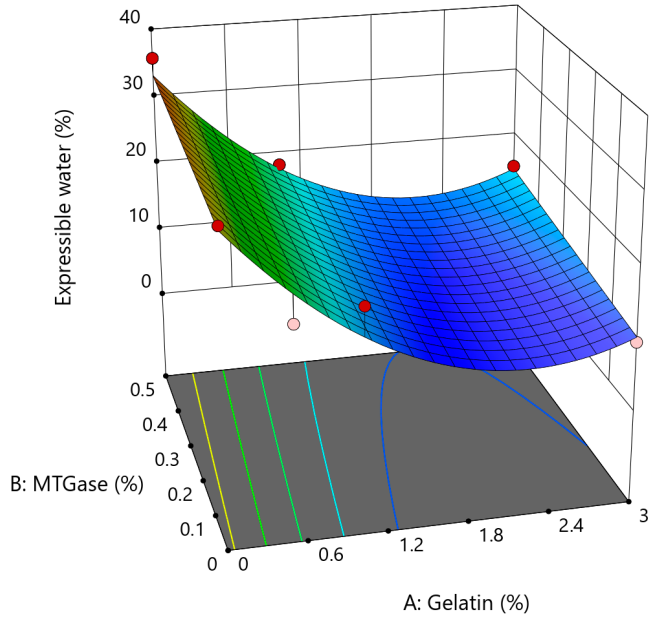


Figure 3. Effect of MTgase and gelatin on the amount of expressible water of crab meat gels.

Micrographs

Microstructure SEM images of crab meat proteins containing different levels of gelatin or MTgase are shown in Figure 4. Control gels (without MTgase) containing 1 % of gelatin (Figure 1C) were more fibrous, less compact and denser than gels containing 0.5 % or 0.3 % of gelatin (Figure 1A and 1E). These images agree with the results obtained for hardness, cohesiveness, and chewiness, all of which were negatively affected by adding 1 % MTgase but increased slightly by adding 3 % gelatin and had a lower amount of extracted water (higher water holding capacity).

Gels containing MTgase and gelatin seemed denser than control gels, suggesting a better interaction among adjacent proteins by the enzyme effect. Gels containing only 0.5 % gelatin and 0.5 % MTgase seemed more fibrous (Figure 1b) than gels containing 1 % gelatin, which showed lower TPA attributes (except springiness) (Figure 1). Gels containing 3 % gelatin and 0.5 % MTgase were denser and more fibrous than gels with 1 % gelatin, and showed better TPA parameters (Figure 1).

It is important to consider that gelatin is a recognized substrate for MTgase (Haug *et al*., 2004), and it has been reported to negatively affect the mechanical properties of surimi gels (Hernández-Briones *et al*., 2009; Kaewudom *et al*., 2013), especially at levels equal or higher than 1.5 %. However, in this study, adding gelatin improved the texture fundamental properties (Young modulus and maximum stress). Additionally, TPA parameters (except springiness) were improved by adding 3 % of gelatin, even after the negative effect caused by adding 1 % (Figure 1).

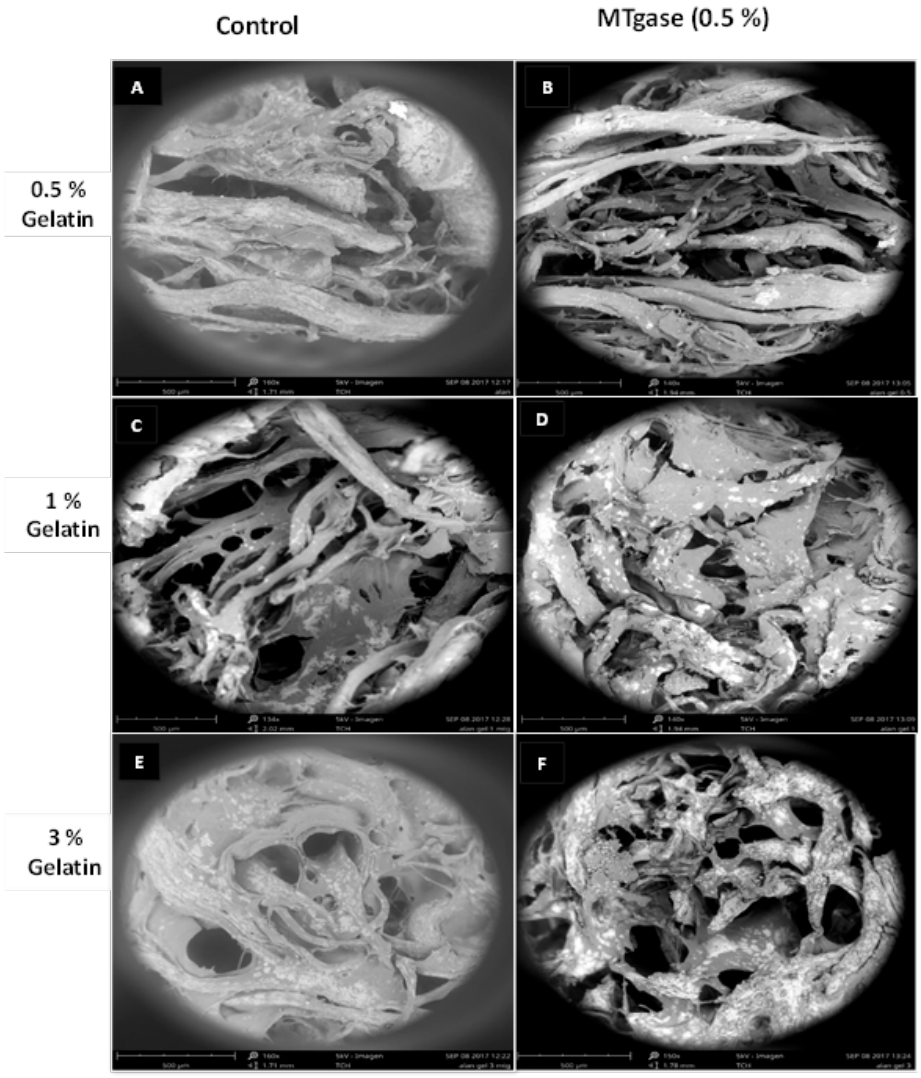


Figure 4. Effect of MTgase and gelatin on SEM micrographs of crabmeat gels.

Table 5. Color parameters of crabmeat gels with MTgase and hydrocolloids.

MTgase (%)	Gelatin (%)	L*	C*	H*
		Control		
0	0	73.73 ± 1.18[a]	8.40 ± 0.88[a]	105.27 ± 1.43[a]
0.5	0	71.16 ± 0.98[a]	8.18 ± 0.62[a]	103.77 ± 2.12[a]
		Gelatin		
0	0.5	73.21 ± 0.66[a]	8.57 ± 0.50[a]	105.01 ± 1.66[a]
	1	72.57 ± 0.78[a]	8.83 ± 0.48[a]	104.47 ± 1.64[a]
	3	74.00 ± 1.81[a]	10.213 ± 1.09[a]	101.39 ± 1.12[a]
0.5	0.5	72.00 ± 0.72[a]	8.76 ± 0.68[a]	104.36 ± 1.95[a]
	1	72.362 ± 1.17[a]	7.51 ± 2.80[a]	102.77 ± 2.32[a]
	3	70.862 ± 2.02[a]	8.28 ± 0.50[a]	102.6 ± 1.17[a]

[a,b] Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$) among treatments (MTgase level for control or % gelatin for each level of MTgase).

Thermally denatured muscle proteins form an opaque and not reversible gel. Gelatin proteins are different as they interact during cooling to form a reversible translucid gel after being thermally denatured. Both of them are recognized as a substrate for MTgase. Meat crab proteins have been reported as a unique and different kind of proteins, which, after being denatured and aggregated by thermal processing, keep the ability of gelling again (Martínez-Robledo *et al*., 2014), suggesting a partially reversible gel. SEM images indicate that gelatin, a protein that forms reversible gels, was able to interact with muscle crab proteins, and both were an appropriate substrate for MTgase, forming a structural network where crab meat proteins-gelatin interactions took place.

CONCLUSIONS

Cooked crab meat proteins formed a tridimensional ordered structure with good mechanical attributes after applying a thermal denaturation-aggregation process. Adding MTgase and gelatin improved the fundamental mechanical properties. However, TPA parameters were negatively affected by the addition of 1 % gelatin, although they were slightly improved by adding 3 % gelatin. Results indicate that both proteins interacted, forming the network that stabilized the gels.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

REFERENCES

Baxter, S. R., and Skonberg, D. I. 2006. Thermal gelation of previously cooked minced meat from Jonah crab (*Cancer borealis*). Journal of Food Science, 71(8), C499-C503.

Baxter, S. R., and Skonberg, D. I. 2008. Gelation properties of previously cooked minced meat from Jonah crab (*Cancer borealis*) as affected by washing treatment and salt concentration. Food Chemistry, 109(2), 332-339.

Bouriga, N., Bahri, W. R., Mili, S., Troudi, D., Mejri, R., Jebali, O., ... and Basyouny Shahin, A. A. 2023. Effect of adding olive oil and garlic on biochemical, microbiological, and sensory properties of blue crab *Portunus segnis* and *Callinectes sapidus* meat canning and storage. Journal of Aquatic Food Product Technology, 32(4), 432-446.

Castro-Briones, M., Calderón, G. N., Velazquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M., and Ramírez, J. A. 2009. Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. Journal of Food Process Engineering, 32(2), 221-234.

Ghribi, F., Bejaoui, S., Chetoui, I., Marengo, M., Bouaziz, M., Soudani, N., ... and El Cafsi, M. H. 2023. Effect of freezing process on the chemical properties of blue swimming crab *Portunus segnis*: Storage stability and acceptability. Journal of Aquatic Food Product Technology, 32(5), 528-541.

Haug, I. J., Draget, K. I., and Smidsrød, O. 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. Food hydrocolloids, 18(2), 203-213.

Hernández-Briones, A., Velázquez, G., Vázquez, M., and Ramírez, J. A. 2009. Effects of adding fish gelatin on Alaska pollock surimi gels. Food hydrocolloids, 23(8), 2446-2449.

Hernández-Robledo, V., Uresti-Marín, R. M., Martínez-Maldonado, M. Á., and Velazquez, G. 2015. Efecto de la transglutaminasa microbiana sobre las propiedades mecánicas de geles de carne de jaiba cocida. CienciaUAT, 10(1), 93-103.

Hernández-Robledo, V., Martínez Maldonado, M. Á., Uresti-Marín, R. M., Ramírez, J. A., and Velázquez, G. 2017. Effect of washing treatment and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins. CyTA-Journal of Food, 15(2), 165-170.

Kaewudom, P., Benjakul, S., and Kijroongrojana, K. 2013. Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase. Food Bioscience, 1, 39-47.

Lam, C. W. Y., and Ikeda, S. 2017. The Young's modulus, fracture stress, and fracture strain of gellan hydrogels filled with whey protein microparticles. Journal of Food Science, 82(5), 1157-1162.

Martínez, M. A., Robledo, V., Velazquez, G., Ramírez, J. A., Vázquez, M., and Uresti, R. M. 2014. Effect of precooking temperature and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins. Food Hydrocolloids, 35, 264-269.

Morales-Azpeitia, R., Balmori-Ramírez, A., Seefoo-Ramos, A. A., and García-Caudillo, J. M. 2021. Evaluation and estimation of reference points for the blue crab, *Callinectes sapidus* (Decapoda: Portunidae) of the Gulf of Mexico. Hidrobiológica, 31(3), 231-243.

Rahman, M. S., Al-Attabi, Z. H., Al-Habsi, N., and Al-Khusaibi, M. 2021. Measurement of instrumental texture profile analysis (TPA) of foods. Techniques to Measure Food Safety and Quality: Microbial, Chemical, and Sensory, 427-465.

Ramírez, J. A., Uresti, R. M., Velazquez, G., and Vázquez, M. 2011. Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: A review. Food Hydrocolloids, 25(8), 1842-1852.

Rodríguez-Castro, J. H., Correa-Sandoval, A., Ramírez-de-León, J. A., and Adame-Garza, J. A. 2017. Modelling the catch and development phases of the blue crab fishery (*Callinectes sapidus*) in the Laguna Madre, Tamaulipas, Mexico. CienciaUAT, 12(1), 96-113.

Siccha, A., and Lock de Ugaz, O. 1992. Hidrocoloides. Revista de Química, 6(2), 171-180.

Trejo-Díaz, G. N., Martínez-Maldonado, M. Á., Uresti-Marín, R. M., Velazquez, G., and Ramírez, J. A. 2021. Improving of gelling capacity of cooked crab meat proteins. Frontiers in Nutrition, 8, 675362.

Uresti, R. M., Velazquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A., and Torres, J. A. 2005. Effect of sugars and polyols on the functional and mechanical properties of pressure-treated arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) proteins. Food Hydrocolloids, 19(6), 964-973.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Effect of zinc and magnesium oxide phytonanoparticles on the production of rebaudiosides and phenolic compounds in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants

Efecto de las fitonanopartículas de óxido de zinc y magnesio en la producción de rebaudiósidos y compuestos fenólicos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni

María Concepción Velázquez-Gamboa[1], Ludwi Rodríguez-Hernández[2], Miguel Abud-Archila[1], Federico Antonio Gutiérrez-Miceli[1], Víctor Manuel Ruíz-Valdiviezo[1], Benjamín Valdez-Salas[3], Dalia Margarita Ferrer-Sánchez[1], María Celina Luján-Hidalgo[2]*

[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] Instituto Tecnológico Superior de Cintalapa, Carretera Panamericana km. 995 C.P. 30400 Cintalapa, Chiapas, México.
[3] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, Baja California, C. P. 21100, México.

ABSTRACT

The demand for natural sweeteners has been increasing. This trend is influenced by several factors, including concerns and controversies surrounding synthetic sweeteners. This study aimed to determine the effect of elicitation with ZnO and MgO phytonanoparticles (PTNPs) on *Stevia rebaudiana* plants. The synthesis of PTNPs is possible due to reduction potential of the natural aqueous extract derived from Moringa oleifera leaves. The characterization of PTNPs was carried out using spectroscopic and microscopic methods. Scanning electron microscope images of the ZnO PTNPs showed the presence of agglomerated rod-shaped nanoparticles, while the MgO PTNPs were irregularly shaped and agglomerated. Dynamic light scattering analysis showed an average size of 9 - 30 nm for ZnO PTNPs and 5 - 10 nm for MgO PTNPs, while zeta potential (ζ) values validated the stability of the PTNPs. The infrared spectra revealed bands corresponding to stretching vibrations of the bonds between the groups involved in the reduction and stabilization of PTNPs. The highest production of rebaudiosides A, E and M was obtained using 1 mg/L of ZnO PTNPs. The elicitation with PTNPs, mainly with ZnO at the concentration of 20 mg/L, induces the production of molecules with antioxidant capacity, obtaining a 137 % increase of chlorogenic acid, while that of caffeic acid is 185 %. These results indicated that the application of ZnO and MgO PTNPs induced a higher content of antioxidant compounds in *Stevia rebaudiana*.

Keywords: Elicitation, Rebaudioside M, Antioxidant compounds, Chlorogenic acid.

RESUMEN

La demanda de edulcorantes naturales ha ido en aumento; Esta tendencia está influenciada por varios factores, incluidas las preocupaciones y controversias en torno a los edulcorantes sintéticos. Este estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la estimulación con fitonanopartículas de ZnO y MgO (PTNPs) de plantas de *Stevia rebaudiana*. La síntesis de PTNPs es posible gracias al potencial de reducción del extracto acuoso natural derivado de las hojas de Moringa oleifera. La caracterización de las PTNPs se realizó mediante métodos espectroscópicos y microscópicos. Las imágenes de microscopio electrónico de barrido de las PTNPs de ZnO mostraron la presencia de nanopartículas aglomeradas en forma de varilla, mientras que las PTNPs de MgO tenían forma irregular y estaban aglomeradas. El análisis de dispersión dinámica de la luz mostró un tamaño promedio de 9 a 30 nm para los PTNPs de ZnO y de 5 a 10 nm para los PTNPs de MgO, mientras que los valores del potencial zeta (ζ) validaron la estabilidad de los PTNPs. Los espectros infrarrojos revelaron bandas correspondientes a vibraciones de estiramiento de los enlaces de los grupos implicados en la reducción y estabilización de los PTNPs. La mayor producción de rebaudiósidos A, E y M se obtuvo utilizando 1 mg/L de ZnO PTNP. La elicitación con PTNPs principalmente con ZnO a partir de la concentración de 20 mg/L induce la producción de moléculas con capacidad antioxidante, obteniendo un aumento del 137 % del ácido clorogénico, mientras que el del ácido cafeico es del 185 %. Estos resultados indicaron que la aplicación de PTNPs de ZnO y MgO indujo un mayor contenido de compuestos antioxidantes en *Stevia rebaudiana*.

Palabras clave: Estimulación, Rebaudiósido M, Compuestos antioxidantes, Ácido clorogénico

INTRODUCTION

At the commercial level, there has been a recent increase in consumer interest for the use of substances of natural origin, especially plant extracts with therapeutic properties, to treat diseases such as obesity, kidney disease, cardiovascular disease, cancer, etc., among which is the stevia plant (Saraiva *et al*., 2020).

Stevia rebaudiana Bertoni is a plant of commercial interest, known for its high content of steviol glycosides (SGs) (Cauich-Cauich *et al*., 2022; Javed *et al*., 2017a). In 2024, the global market for *S. rebaudiana* will be valued at $405.6 million and is projected to reach $739.4 million in 2034,

*Author for correspondence: María Celina Luján Hidalgo
e-mail: maria.lh@tuxtla.tecnm.mx
Received: April 16, 2024
Accepted: August 13, 2024
Published: Septembre 4, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2313

reflecting a compound annual growth rate (CAGR) of 6.2 % (Stevia Market, 2024).

Stevioside (Stev), rebaudioside A (Reb A) and rebaudioside C (Reb C), are the most abundant SGs in the leaves, and commercially these molecules have been attributed the sweetening power. Other SGs, such as rebaudiosides D, E, and M, have greater sweetening capacity, however, they are found at very low concentrations (Gupta *et al*., 2013). In addition, other studies have shown that the leaves of *S. rebaudiana* contain antioxidant compounds such as ascorbic acid, gallic acid and other phenolic compounds, including flavonoids, alkaloids, chlorophylls, xanthophylls and hydroxycinnamic acids (Pandey *et al*., 2018) that confer additional functional properties to the sweetening power, so the implementation of agronomic techniques that induce the biosynthesis of these compounds is an area of interest.

Today, the pharmaceutical and food industries have a growing interest in improving the quantity and quality of the active principles of medicinal plants (Ramezani *et al*., 2020). Increasing the production of secondary metabolites by modifying plant metabolism, is an efficient approach that could be achieved through several means.

Elicitors are biotic or abiotic substances or factors that can induce a metabolic response in plants depending mainly on their concentration, chemical nature, size and growth stage of the plant (Wang *et al*., 2017). Some phytohormones, such as methyl jasmonate (MeJa), have been used as elicitors. This phytohormone plays a crucial role in signaling pathways leading to the accumulation of secondary metabolites, which can have diverse applications including pharmaceuticals, flavors, and fragrances. However, their cost can be a challenge, especially for large-scale applications (Lucho *et al*., 2018; Moharramnejad *et al*., 2019).

Recently, research in the field of nanotechnology for signaling the effects of environmental stress on plant physiology is advancing at a rapid pace (Abdel-Aziz *et al*., 2020). Nanotechnology has the potential to revolutionize agriculture and significantly impact food and crop production (Magdaleno-García *et al*., 2023). Scientists are increasingly interested in employing biotechnological techniques to enhance the production of secondary metabolites and explore various applications in agriculture such as the formulation of nanopesticides and nanofertilizers (Nongbet *et al*., 2022).

Recent studies have shown that nanoparticles can act as elicitors (Vijayakumar *et al*., 2022) as these particles can rapidly penetrate plant cells, elevate protein levels and stimulate gene expression (Masarovicová *et al*., 2013). Javed *et al*. (2017a) investigated the effect of different concentrations of zinc oxide chemical nanoparticles (ZnO NPs) on growth and steviol glycoside production in micropropagated shoots of *S. rebaudiana*. They found that 1 mg/L of ZnO nanoparticles produced the highest percentage of shoot formation (89.6 %), by doubling the content of stevioside and rebaudioside A compared to the control, suggesting a positive influence of nanoparticles on plant growth and glucoside production.

The green synthesis of nanoparticles is particularly attractive due to their biocompatibility, low toxicity, and eco-friendly nature (Bouttier-Figueroa *et al*., 2023). Key considerations for synthesizing and producing plant-based nanoparticles include the selection of environmentally friendly or non-harmful solvents for stabilization (Raliya *et al*., 2014). Traditional chemical methods used in various industries can be costly and environmentally hazardous, especially when they involve toxic and hazardous chemicals (Krishnani *et al*., 2022). This has driven increased interest in green chemistry and sustainable practices that aim to minimize the environmental and health impacts of chemical processes (Gowri *et al*., 2019).

The main objective of this research was to determine how the application of ZnO and MgO nanoparticles as elicitors affects the content of certain compounds in dried *Stevia rebaudiana* leaves. Specifically, the study aims to measure changes in the levels of rebaudiosides A, D, M and address the metabolic profile of phenolic compounds such as gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine.

MATERIAL AND METHODS

Synthesis and characterization of ZnO and MgO phytonanoparticles from *Moringa oleifera*

The plant extract used for the synthesis of PTNPs was obtained from previously pulverized dehydrated leaves of *Moringa oleifera*, as described by Rodríguez-Pérez *et al*. (2015). Briefly, 500 mg of plant material were mixed with 25 mL of distilled water and maintained at 25 °C for 1 hour under continuous magnetic stirring. The mixture was sonicated at 360 W (COLE-PARMER, Vernon Hills, IL, USA) for 15 minutes at 25 °C and centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes (HERMLE, Germany) to remove solids. The extract was filtered through a 0.45 µm Millipore membrane.

The synthesis of zinc and magnesium PTNPs was carried out following the methodology described by Chaudhuri and Malodia (2017), with modifications as reported by Velázquez-Gamboa *et al*. (2021).

Characterization techniques were used to obtain a comprehensive understanding of the chemical composition, size distribution, and physical morphology of ZnO and MgO PTNPs, which were characterized by FT-IR (NICOLET, Wisconsin, USA), SEM (JEOL 6010LA), dynamic light scattering (DLS, Montgomeryville, PA, USA), and ζ potential (Microtrac, Montgomeryville PA, USA). USA) (Selvakesavan *et al*., 2023).

Plant cultivation (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and elicitation with ZnO and MgO phytonanoparticles

Stevia rebaudiana (Var. Morita II) plants were grown in plastic seedbeds using a mixture of peat and agrolite (4:1 v/v). After the development of 10 true leaves, plants were transplanted into polyethylene bags (20 x 30 cm) containing the same inert substrate. The experiment was carried out in an anti-aphid house in Cintalapa de Figueroa, Chiapas, Mexico (16°45'N 93°51'W). The temperature in the anti-aphid house ranged between 29 - 32 °C and relative humidity below 70 %. Plant

nutrition was provided with modified Hoagland nutrient solution without zinc and magnesium.

At 30 days after transplantation (15 and 20 true leaves), different experimental treatments with ZnO and MgO PTNPs were applied. Plants were sprayed individually from the roots twice a week (1 mL per plant) for four weeks. The treatments evaluated were: T1 (control without PTNPs), T2 (MeJa 22 mg/L), T3 (PTNPs ZnO 1 mg/L), T4 (20 mg/L ZnO PTNPs), T5 (30 mg/L ZnO PTNPs), T6 (1 mg/L MgO PTNPs), T7 (20 mg/L MgO PTNPs), and T8 (30 mg/L MgO PTNPs). At the end of the experiment, plants were harvested and dried at 60 °C for 48 h. They were ground and stored in the dark at 4 °C until use.

Stevia rebaudiana extract preparation

The method described by Gasmalla *et al*. (2017) was used for the extraction of the steviol glycosides.

Rebaudiosides A, D, E and M quantification

The quantification of SGs (rebaudioside A, D and M) present in the extract of *S. rebaudiana* Bertoni was carried out by HPLC UV-Visible (High-performance liquid chromatography with UV-Vis detector, Flexar PerkinElmer, USA), according to the methodology reported by Velázquez-Gamboa *et al*. (2021).

Gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, and caffeine contents

The system used for the analysis of the various phenolic compounds consisted of a Perkin Elmer high-performance liquid chromatograph. A reversed-phase C18 column (150 x 4.4 mm) was used at a wavelength of 270 nm for gallic acid and caffeine, and 325 nm for chlorogenic acid and caffeic acid. The mobile phases used were 0.1 % formic acid (solvent A) and methanol (solvent B). Twenty µL of sample were injected, a solvent gradient elution program was used starting at a 15 % (A)/85 % (B), increasing to 80 % (A)/20 % (B) throughout 50 min, then decreasing to 15 % (A)/85 % (B) over 2 min, and finally maintaining the same ratios for 5 min. External standards of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, and caffeine HPLC grade (Sigma Aldrich, USA) were used, and the phenolic compounds were expressed in mg/g of dry leaf.

Statistical analysis

A completely randomized design was used, considering 21 replicas per treatment. An analysis of variance and Fisher's LSD test were performed ($p < 0.005$). Statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XVII software.

RESULTS AND DISCUSSION

ZnO and MgO phytonanoparticles characterization

The formation of PTNPs was evidenced by the color changes in the precursor solutions and the subsequently obtained colloidal solution. The characterization of ZnO and MgO PTNPs synthesized from *Moringa oleifera* was carried out by scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS) and FT-IR spectroscopy.

FT-IR and SEM analysis

The FT-IR spectrum of the ZnO PTNPs is shown in Fig. 1a. Molecules such as alcohols, phenols, and carboxylic acids present in the plant extract can interact with the zinc surface and contribute to the stabilization of ZnO PTNPs (Shaikhaldein *et al*., 2021; Fakhari *et al*., 2019). Characteristic IR bands appeared at 3390 and 2825 cm^{-1} corresponding to the stretching vibra-

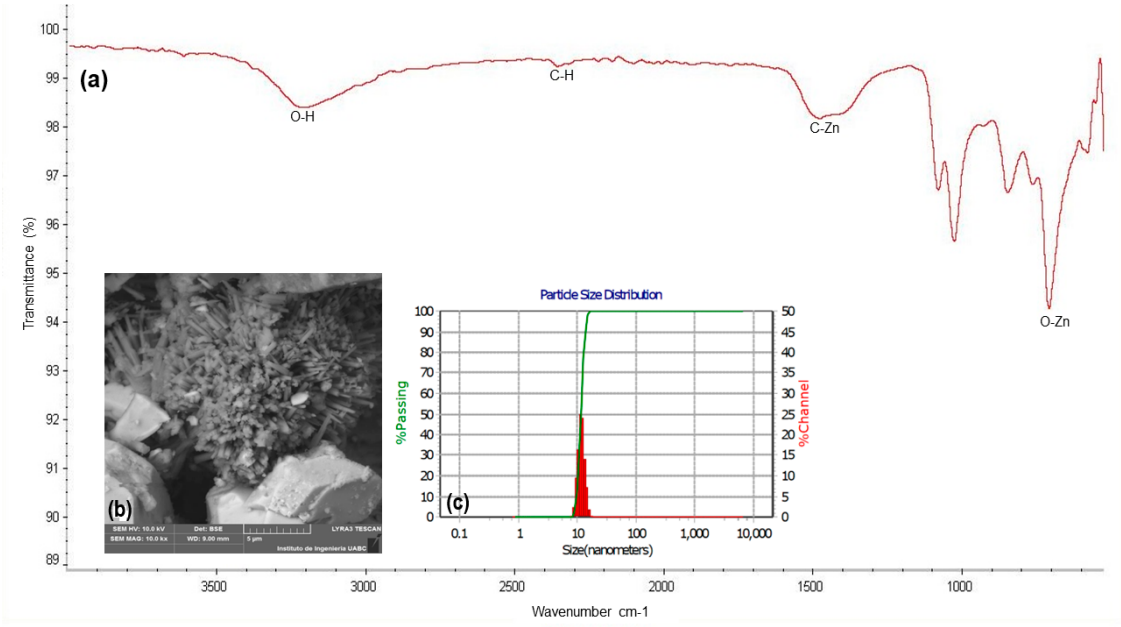


Figura 1. Caracterización de fitonanopartículas de ZnO sintetizadas por *M. oleifera*. a) Espectrofotómetro infrarrojo (FT-IR), b) Micrografía electrónica de barrido (SEM), c) Histograma de distribución de tamaño de partícula (DLS).
Figure 1. Characterization of ZnO phytonanoparticles synthesized by *M. oleifera*. a) Infrared spectrum (FT-IR)), b) Scanning electron micrograph (SEM), c) Particle size distribution histogram (DLS).

tions of O-H and C-H bonds respectively (Senthilkumar *et al*., 2017). The band observed at 1500 cm^{-1} can be attributed to the asymmetric and symmetric stretching of carbonyls (C=O) (Moghaddam *et al*., 2017), while the band at 871 cm^{-1} could be related to the stretching vibrations of Zn-O bonds (Alamdari *et al*., 2020; Fakhari *et al*., 2019). On the other hand, the study of MgO PTNPs (Fig. 2a) shows the presence of a broad band of the hydroxyl group at 3381 cm^{-1} (Khajuria *et al*., 2021; Alamdari *et al*., 2020). Two distinct bands are observed in the wave number regions at 1429 and 1106 cm^{-1} which are attributed to the bending vibrations of the adsorbed water molecule and the surface hydroxyl group (-OH) (Boro *et al*., 2020). The band observed at 531 cm^{-1} indicates the formation of the Mg-O bond (Lucho *et al*., 2018).

SEM imaging of the ZnO PTNPs revealed agglomerated rod-like PTNPs with a diameter range of 3 - 8 nm (Fig. 1b). Velázquez-Gamboa *et al*. (2021) reported the synthesis of ZnO PTNPs from *Moringa oleifera* in the form of rod-shaped, elongated with an average size of 13 nm. The image corresponding to the MgO PTNPs shows that they are irregularly shaped, and highly agglomerated, with an average size of 45 nm (Fig. 2b). Similar results were reported by Amrulloh *et al*. (2021), who synthesized MgO PTNPs from *M. oleifera* with spherical shape and average size ranging from 20 to 80 nm. The study by Gupta *et al.* (2020) highlights the importance of various physicochemical factors in controlling the synthesis of green nanoparticles. In fact, the mentioned factors, including the optimal concentration of metal ions, pH, temperature, concentration of precursors and reducing agents, and reaction time, play fundamental roles in the synthesis of PTNPs, and significantly affect their physicochemical properties and functionality. However, to date, the synthesis and application of specific forms of PTNPs have not been widely reported or established in the scientific literature. The synthesis and application of nanoparticles, especially in the context of green or environmentally friendly methods, are active areas of research and new developments occur periodically.

DLS and ζ potential analysis

The DLS technique is widely used to determine the hydrodynamic diameter of suspended particles. The average hydrodynamic size of the ZnO PTNPs (Fig. 1c) synthesized in this study was in the range of 9 nm to 30 nm in a stabilized medium. The ζ potential defines the colloidal stability, it is a typical measure of the surface charge of a particle (Mehta *et al*., 2021). In this study, the ζ potential of ZnO PTNPs in distilled water was +200 mV, therefore, they can be considered as strongly cationic which favors their dispersion in solution. When the particle is partially dispersed in the medium, the ζ potential tends to be positive (Campbell *et al*., 2019). The exact ζ potential required for stability depends on the specific colloidal system, including the nature of the particles, their size, surface charge, and the surrounding medium. In addition, factors such as temperature and ionic strength can also affect the ζ potential and thus the stability of colloids.

The histogram in Fig. 2c, shows the size distribution of MgO PTNPs, which were observed in the range of 5 - 10 nm with a mean size of 7.5 nm. Moorthy *et al*. (2015) reported the synthesis of MgO PTNPs from *Neem* leaf with a size of 43 nm, while Ali *et al*. (2020) reported the size MgO PTNPs from *Persimmon* extract with a size of 23.88 nm. Regarding the surface charge of the biosynthesized MgO PTNPs MgO a ζ potential of +39.5 mV was determined. These results were similar to those reported by Suresh *et al*. (2014), who reported a ζ potential of +39 mV in MgO PTNPs from *Calotropis gigantean,* indicating the formation of stable nanoparticles in solutions at slightly acidic pH.

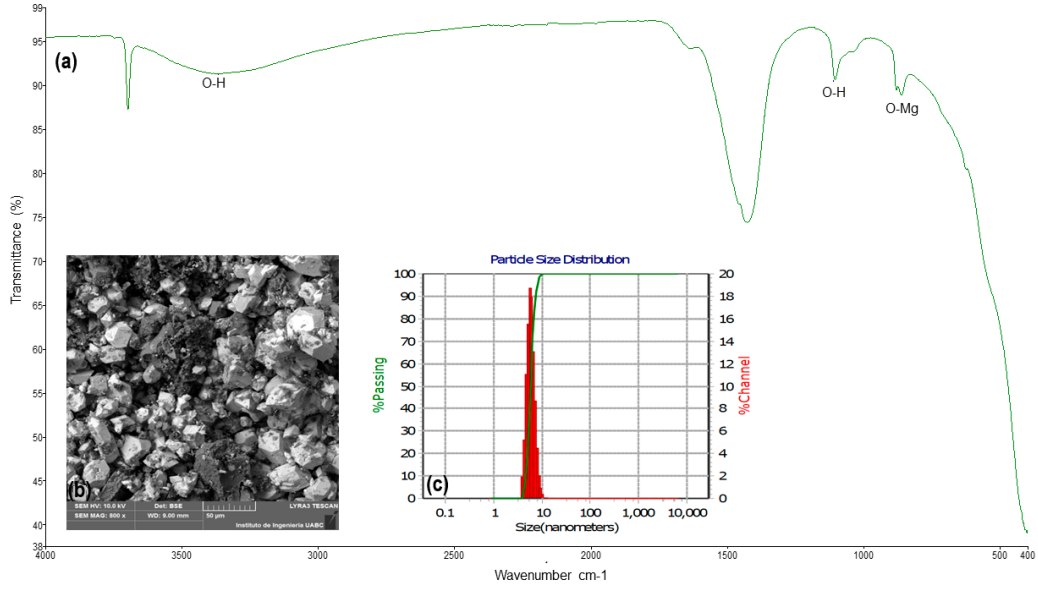


Figura 2. Caracterización de fitonanopartículas de MgO sintetizadas por *M. oleifera*. a) Espectro de infrarrojo (FT-IR), b) Micrografía electrónica de barrido (SEM), c) Histograma de distribución de tamaños de partícula (DLS).
Figure 2. Characterization of MgO phytonanoparticles synthesized by *M. oleifera*. a) Infrared spectrum (FT-IR), b) Scanning electron micrograph (SEM), c) Particle size distribution histogram (DLS).

Rebaudioside A, D, E, and M content in elicited *Stevia rebaudiana* Bertoni plants

Recently, some researchers have reported that PTNPs influence the production of secondary metabolites in plants with medicinal properties (Selvakesavan *et al*., 2023). Rebaudioside A is the most abundant compound in *Stevia rebaudiana* extract; therefore, the commercial value of this product is mainly defined by its content. However, there are other rebaudiosides with similar sweetening power to Reb A, such as Reb D and Reb M, which, although found in low concentrations, could have a significant impact on the sensory properties of *S. rebaudiana*. Regarding the content of rebaudioside A, in Table 1 shows that there is a significant statistical difference ($p < 0.05$) between treatments, where the plants that were elicited with MeJa showed an increase of 18 % with respect to the control plants. These results were consistent with those described by Lucho *et al*. (2018), who reported that the application of this phytohormone induced an increase in rebaudioside A, after 24 and 72 hours of application.

Regarding the treatments with added PTNPs, it was observed that at low concentrations (T3 and T6) there was a significant increase between 4 and 5 %, respectively, compared to the control, while at higher concentrations their content decreased. Javed *et al*. (2017a) reported similar results in the content of steviol glycosides using 1 mg/L ZnO PTNPs in the culture of micropropagated *S. rebaudiana* shoots. These results suggest that PTNPs of both metals at concentrations of 1 mg/L could generate a signaling cascade that probably induces a higher expression or activity of the enzyme UGT76G1. On the other hand, the increase in PTNPs concentrations could induce greater stress in plants by modifying the metabolism, towards the synthesis of molecules with antioxidant capacity to regulate cell damage (Table 2), thereby inhibiting the synthesis of steviol glycosides.

The results for Reb D and Reb E content were reported as Reb D equivalents, because both molecules are isomers and have the same retention time in the chromatographic analysis used. Table 1 shows that there is no significant statistical difference ($p < 0.05$) between the controls, although the same enzyme catalyzes the glycosylation for the synthesis of these molecules using Reb A as precursor. On the other hand, the application of ZnO and MgO PTNPs, at all the concentrations studied, significantly reduced their content up to 26 %.

As for Reb M, the plants treated with ZnO at 1 mg/mL increased its content by 3 % with respect to the control, while the other treatments did not show significant statistical differences with respect to the control plants.

Several authors have reported that the use of elicitors and phytohormones such as salicylic acid, paclobutrazol, MeJa, some auxins such as gibberellins and nanoparticles (Ag, CuO, ZnO-PEG, ZnO-PVP, CuO-PEG and CuO-PVP) (Gupta *et al*., 2015; Karimi *et al*., 2015; Javed *et al*., 2017a; Javed *et al*., 2017b; Saraiva *et al*., 2020; Wang *et al*., 2021) of chemical, biological and commercial synthesis, affect the synthesis of secondary metabolites, mainly in the production of SGs and compounds with antioxidant capacity. Therefore, ZnO and MgO PTNPs may exhibit similar catalytic properties in certain chemical reactions and could play a similar role in the synthesis of steviol glycosides, depending on the specific reaction conditions and mechanisms involved. However, it is important to note that the catalytic behavior of nanoparticles can

Cuadro 1. Contenido de rebaudiósidos A, D y M en extracto acuoso de hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni estimulados con fitonanopartículas de óxido de zinc y magnesio.

Table 1. Rebaudiosides A, D and M content in aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni dried leaves elicited with zinc and magnesium oxide phytonanoparticles.

Treatments		PTNPs mg/ L	Rebaudioside A	Rebaudioside D	Rebaudioside M
			mg/ g DW		
T1	Deionized water	0	43.38 c	15.64 a	2.55 b
T2	Metil jasmonate	0	51.19 a	15.82 a	2.44 c
T3	ZnO	1	45.22 b	13.12 b	2.63 a
T4		20	38.8 de	12.05 cd	2.54 b
T5		30	37.67 e	11.71 d	2.51 bc
T6	MgO	1	45.86 b	12.77 bc	2.5 bc
T7		20	42.3 c	12.32 cd	2.52 bc
T8		30	40.49 e	12.4 bcd	2.55 b
		LSD (0.05)	1.73	0.72	0.085

LSD: Least significant difference. Values with the same letter in each column have no statistically significant difference between treatments. T2 (22.43 mg/L Metil jasmonate)

Table 2. Content of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine, in aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni dried leaves elicited with zinc and magnesium oxide phytonanoparticles.

Cuadro 2. Contenido de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico y cafeína en extracto acuoso de hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni estimulados con fitonanopartículas de óxido de zinc y magnesio.

Treatments		PTNPs mg/ L	Gallig acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Caffeine
			mg/ kg DW			
T1	Deionized water	0	63.1 a	749.2 de	20.1cd	7.8 b
T2	Metil jasmonate	0	62.3 ab	818.0 d	23 cd	6.0 c
T3	ZnO	1	55.3 c	746.7 e	27.3 c	7.4 bc
T4		20	55.2 c	1777.0 a	26.4 c	10.4 a
T5		30	58.7 bc	1425.2 b	41.6 b	7.4 bc
T6	MgO	1	62.2 ab	142.0 g	17.7 d	5.9 c
T7		20	64.5 a	451.9 f	26.8 c	4.2 d
T8		30	59.2 b	1011.9 c	57.4 a	6.5 bc
		LSD (0.05)	4.82	69.3	1.54	1.54

LSD: Least significant difference. Values with the same letter in each column have no statistically significant difference between treatments. T2 (22.43 mg/L Metil jasmonate)

be highly dependent on several factors, including size, morphology, surface properties, and specific reaction conditions. Lucho *et al.* (2018) reported that MeJa does not negatively affect the expression of genes involved in SGs synthesis. They demonstrated the positive influence of MeJa on the activation of the genes responsible for encoding enzymes in the SGs biosynthesis pathway, reporting that about 12 (80 %) genes catalogued by this elicitor as a strong candidate for use in SGs production optimization. A statistically significant difference was observed in Reb M content, and with these results, it could be assumed that PTNPs act similarly in gene activation; Therefore, PTNPs could induce a higher gene expression of enzymes responsible for stevioside glycosylation, these enzymes are known as UDP-glycosyltransferases.

Gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine content

The production of non-enzymatic antioxidants (phenolic compounds) is the protective mechanism against reactive oxygen species (ROS) in plants and their accumulation varies in different environments. Several studies have reported that the use of metal PTNPs induces the synthesis of these metabolites (Gowri *et al*., 2019; Moharramnejad *et al*., 2019; Velázquez-Gamboa *et al*., 2021). Several researchers have reported that metal PTNPs influence the synthesis of secondary metabolites in plants. *Stevia rebaudiana* has an added value because it is a plant that has a high content of phenolic compounds. However, there are some of them with greater antioxidant capacity, such as flavonoids, which, although found in lower concentrations, have a significant impact on the commercial value of the plant.

Near the flavonoid content, those of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine present in the leaves of *S. rebaudiana* nanoelicited are shown in Table 2. It was observed that the control with MeJa did not modify the content of gallic acid, chlorogenic acid, or caffeic acid, only caffeine decreased significantly. However, the elicitation with PTNPs mainly with ZnO at 20 mg/L induced the production of molecules with antioxidant capacity. Chlorogenic acid increased up to 137 %, while caffeic acid increased by 185 %. Likewise, in the results of the caffeine studies, a significant statistical difference was observed between treatment T4 (20 mg/L ZnO PTNPs) and T1 (negative control) showing a 133 % increase. In this case, the results obtained indicate that the application of ZnO and MgO PTNPs induces an increase in antioxidant compounds content. In general, Chandra *et al*. (2017) suggests that PTNPs can stimulate a strong immune response in *Camellia chinensis* plants, leading to the upregulation of defense-related genes, increased activity of defense enzymes, and accumulation of phenolic compounds, all of which play a crucial role in the plant's ability to defend itself against potential threats such as pathogens.

The results of the study indicate that an increase in PTNPs concentration leads to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), but does not reach toxic levels for the plant. Instead, the plant responds by increasing the production of antioxidant compounds. This response is consistent with the concept of homeostasis in plants. Hussain *et al.* (2021) indicate that oxidative stress was ameliorated in *Persicaria hydropiper* L. seedlings exposed to ZnO NPs through increased production of free proline, phenolics, flavonoids, and the activation of antioxidant enzymes.

CONCLUSIONS

The elicitation of *S. rebaudiana* with ZnO and MgO PTNPs induces the biosynthesis of rebaudioside A and M, which could improve the sweetening potential of its extracts, in addition to a significant increase in the content of chlorogenic acid and caffeic acid, molecules that contribute to the antioxidant activity. Consequently, the application of ZnO and MgO PTNPs to *S. rebaudiana* plants probably gives added commercial value to the crop. However, it is necessary to continue the studies to evaluate the phytotoxic effect of the extract obtained from plants treated with these PTNPs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Instituto Técnologico de Tuxtla Gutierrez for providing the facilities

FUNDING

The authors thank CONAHCyT Mexico for providing financial support to Velázquez-Gamboa with Scholarship: 849710 to carry out this research.

CONFLICTS OF INTEREST

Consent for Publication: All authors agreed to publish this paper in this journal.

Ethical approval: This study does not contain any studies with human participants or animals performed.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Abdel-Aziz, M.M., Emam, T.M., and Elsherbiny, E.A. 2020. Bioactivity of magnesium oxide nanoparticles synthesized from cell filtrate of endobacterium *Burkholderia rinojensis* against *Fusarium oxysporum*. Materials Science and Engineering C, 109, 110617. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110617

Alamdari, S., Ghamsari, M.S., Lee, C., Han, W., Park, H.H., Tafreshi, M.J., Afarideh, H. and Ara, M.H. 2020. Preparation and characterization of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Sambucus ebulus*. Applied Sciences, 10(10), 3620. https://doi.org/10.3390/app10103620

Ali, R., Shanan, Z.J., Saleh, G.M. and Abass, Q. 2020. Green synthesis and the study of some physical properties of MgO nanoparticles and their antibacterial activity. Iraqi Journal of Science, 61(2), 266-276. https://doi.org/10.24996/ijs.2020.61.2.9

Amrulloh, H., Fatiqin, A., Simanjuntak, W., Afriyani, H. and Annissa, A. 2021. Antioxidant and antibacterial activities of magnesium oxide nanoparticles prepared using aqueous extract of *Moringa oleifera* Bark as green agents. Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science, 1(1), 44-53. https://doi.org/10.47352/jmans.v1i1.9

Boro, B., Nath, A.K., Barthakur, M. and Kalita, P. 2020. Synthesis and characterization of MgO nanoparticle and its in vitro cytotoxic effect on erythrocytes. In: Ramkrishna, D., Sengupta, S., Dey Bandyopadhyay, S., Ghosh, A. (eds) Advances in Bioprocess Engineering and Technology. Lecture Notes in Bioengineering. Springer, Singapore. pp. 199-207. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7409-2_20

Bouttier-Figueroa, D.C., Cortez-Valadez, M., Flores-Acosta, M. and Robles-Zepeda, R.E. 2023. Synthesis of metallic nanoparticles using plant's natural extracts: Synthesis mechanisms and applications. Biotecnia, 25(3): 125-139. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.1916

Campbell, J., Burkitt, S., Dong, N. and Zavaleta, C. 2019. Nanoparticles for biomedical applications, chapter 9: nanoparticle characterization techniques (Eun, J. C., Lorraine, L. Carlos R., ed.), Elsevier. pp. 129-144. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00009-6

Cauich-Cauich, R., Tun-Suárez, J.M., Cristóbal-Alejo, J., Hererra-Parra, E., Andueza-Noh, R. and Lozano-Contreras, M.G. 2022. Evaluación de consorcios micorrícicos arbusculares nativos en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento y fotosíntesis de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biotecnia 25(1): 67-68. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1765

Chandra, S., Chakraborty, N., Panda, K. and Acharya, K. 2017. Chitosan-induced immunity in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze against blister blight disease is mediated by nitric-oxide. Plant Physiology and Biochemistry, 115, 298-307. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.008

Chaudhuri, S.K. and Malodia, L. 2017. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Calotropis gigantea*: Characterization and its evaluation on tree seedling growth in nursery stage. Applied Nanoscience, 7, 501-512. https://doi.org/10.1007/s13204-017-0586-7

Fakhari, S., Jamzad, M. and Kabiri, F.H. 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: a comparison. Green Chemistry Letters and Reviews, 12, 19-24. https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1547925

Gasmalla, M.A., Yang, R., Musa, A., Hua, X. and Ye, F. 2017. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. Arabian Journal of Chemistry, 10(5), 726-731. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012

Gowri, M., Latha, N. and Rajan, M. 2019. Copper oxide nanoparticles synthesized using *Eupatorium odoratum*, *Acanthospermum hispidum* leaf extracts, and its antibacterial effects against pathogens: A comparative study. BioNanoScience, 9, 545-552. https://doi.org/10.1007/s12668-019-00655-7

Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S. and Rai, G.K. 2013. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. Journal of Medicinal Plants Research, 7(46), 3343-3353. https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5276

Gupta, P., Sharma, S. and Saxena, S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. Applied Biochemistry and Biotechnology, 176, 863-874. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1616-0

Gupta, M., Tomar, R.S., and Mishra, R.K. 2020. Factors affecting biosynthesis of green nanoparticles. Our Heritage, 68(30), 10530-10555.

Hussain, F., Hadi, F. and Rongliang, Q. 2021. Effects of zinc oxide nanoparticles on antioxidants, chlorophyll contents, and proline in *Persicaria hydropiper* L. and its potential for Pb phytoremediation. Environmental Science and Pollution Research, 28, 34697-34713. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13132-0

Javed, R., Usman, M., Yücesan, B., Zia, M. and Gürel, E. 2017a. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiology and Biochemistry, 110, 94-99. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.032

Javed, R., Zia, M., Yücesan, B. and Gürel, E. 2017b. Abiotic stress of ZnO-PEG, ZnO-PVP, CuO-PEG and CuO-PVP nanoparticles enhance growth, sweetener compounds and antioxidant activities in shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. IET Nanobiotechnology. 11, 898-902. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0247

Karimi, M., Hashemi, J., Ahmadi, A., Abbasi, A., Pompeiano, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L. and Angelini, L.G. 2015. Opposing effects of external gibberellin and daminozide on Stevia growth and metabolites. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175, 780-791. https://doi.org/10.1007/s12010-014-1310-7

Khajuria, A.K., Kumari, M., Kandwal, A., Singh, A. and Bisht, N.S. 2021. Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from two different zinc sources and their antimicrobial activity. BioNanoScience. 11, 793-809. https://doi.org/10.1007/s12668-020-00802-5

Krishnani, K.K., Boddu, V.M. and Chadha, N.K. 2022. Metallic and non-metallic nanoparticles from plant, animal, and fisheries wastes: potential and valorization for application in agriculture. Environmental Science and Pollution Research, 29, 81130-81165. https://doi.org/10.1007/s11356-022-23301-4

Lucho, S.R., Do-Amaral, M.N., Milech, C., Ferrer, M.Á., Calderón, A.A., Bianchi, V.J. and Braga, J.B. 2018. Elicitor-induced transcriptional changes of genes of the steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Growth Regulation, 37, 971-985. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9795-x

Magdaleno García, G., Juárez Maldonado, A., Betancourt Galindo, R., González Morales, S., Cabrera de la Fuente, M., Sánchez Vega, M. and Méndez, A. 2023. Zinc oxide nanoparticle morphology modify germination and early growth of bell pepper seedlings. Biotecnia 25(3): 5-1. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.1908

Masarovicová, E. and Králová, K. 2013. Metal nanoparticles and plants. Ecological Chemistry and Engineering S, 20(1), 9-22. https://doi.org/10.2478/eces-2013-0001

Mehta, M.R., Mahajan, H.P. and Hivrale, A.U. 2021. Green synthesis of chitosan capped-copper nano biocomposites: synthesis, characterization, and biological activity against plant pathogens. BioNanoScience, 11, 417-427. https://doi.org/10.1007/s12668-021-00823-8

Moghaddam, A.B., Moniri, M., Azizi, S., Rahim, R.A., Ariff, A., bin-Saad, W.Z., Namvar, F., Navaderi, M. and Mohamad, R. 2017. Biosynthesis of ZnO nanoparticles by a new *Pichia kudriavzevii* yeast strain and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules. 22(6), 872. https://doi.org/10.3390/molecules22060872

Moharramnejad, S., Azam, A.T., Panahandeh, J., Dehghanian, Z. and Ashraf, M. 2019. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on in vitro growth, stevioside production, and oxidative defense system in *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech, 21, 1031-1038. https://doi.org/10.1007/s12355-019-00727-8

Moorthy, S.K., Ashok, C.H., Rao, K.V. and Viswanathan, C. 2015. Synthesis and characterization of MgO nanoparticles by neem leaves through green method. Mater Today, 2, 4360-4368. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.10.027

Nongbet, A., Mishra, A.K., Mohanta, Y.K., Mahanta, S., Ray, M.K., Khan, M., Baek, K.H. and Chakrabartty, I. 2022. Nanofertilizers: A smart and sustainable attribute to modern agriculture. Plants, 11(19), 2587. https://doi.org/10.3390/plants11192587

Stevia Market Outlook from 2024 to 2034. [Consultado 06 de agosto 2024] 2024. https://www.futuremarketinsights.com/reports/global-stevia-market

Pandey, D.K. and Dey, A. 2018. HPTLC Analysis of the antioxidant and possible antidiabetic chlorogenic acid in the in situ and in vitro populations of the low-calorie sweetener *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Analytical Chemistry Letters, 8, 872-881. https://doi.org/10.1080/22297928.2018.1515657

Ramezani, M., Asghari, S., Gerami, M., Ramezani, F. and Karimi, A.M. 2020. Effect of silver nanoparticle treatment on the expression of key genes involved in glycosides biosynthetic pathway in *Stevia rebaudiana* B. Plant Sugar Tech, 22, 518-527. https://doi.org/10.1007/s12355-019-00786-x

Raliya, R., Tarafdar, J.C., Choudhary, K., Mal, P., Raturi, A., Gautam, R. and Singh, S.K. 2014. Synthesis of MgO nanoparticles using *Aspergillus tubingensis* TFR-3. Journal of Bionanoscience, 8, 34-38. https://doi.org/10.1166/jbns.2014.1195

Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2015. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. Industrial Crops and Products, 66, 246-254. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.002

Saraiva, A., Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F. and Raposo, A. 2020. Natural sweeteners: The relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(17):6285. https://doi.org/10.3390/ijerph17176285

Selvakesavan, R.K., Kruszka, D., Shakya, P., Mondal, D. and Franklin, G. 2023. In nanomaterial interactions with plant cellular mechanisms and macromolecules and agricultural implications, chapters 2: impact of nanomaterials on plant secondary metabolism. (Jameel, M. Lina, M. Mohan, J. ed), Springer Cham pp. 133-170. https://doi.org/10.1007/978-3-031-20878-2_6

Senthilkumar, N., Nandhakumar, E., Priya, P., Soni, D., Vimalan, M. and Vetha, I. 2017. Synthesis of ZnO nanoparticles using leaf extract of: *Tectona grandis* (L.) and their anti-bacterial, anti-arthritic, antioxidant and in vitro cytotoxicity activities. New Journal of Chemistry, 41, 10347-10356. https://doi.org/10.1039/c7nj02664a

Shaikhaldein, H.O., Al-qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M., Tarroum, M., Salih, A.M., Gaafar, A.Z., Alshameri, A., Alansi, S., Alenezi, N.A. and Alfarraj, N.S. 2021. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Ochradenus arabicus* and their effect on growth and antioxidant systems of *Maerua oblongifolia*. Plants, 10(9), 1808. https://doi.org/10.3390/plants10091808.

Suresh, J., Yuvakkumar, R., Sundrarajan, M. and Hong, S.I. 2014. Green synthesis of magnesium oxide nanoparticles. Advanced Materials Research, 952, 141-144. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.952.141

Velázquez-Gamboa, M.C., Rodríguez-Hernández, L., Abud-Archila, M., Gutiérrez-Miceli, F.A., González-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., González-Terreros, E. and Luján-Hidalgo, M.C. 2021. Agronomic biofortification of *Stevia rebaudiana* with zinc oxide (ZnO) phytonanoparticles and antioxidant compounds. Sugar Tech, 23, 453-460. https://doi.org/10.1007/s12355-020-00897-w

Vijayakumar, S., Punitha, V.N. and Parameswari, N. 2022. Phytonanosynthesis of MgO nanoparticles: Green Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation. Arabian Journal for Science and Engineering, 47, 6729-6734. https://doi.org/10.1007/s13369-021-06107-3

Wang, J., Li, J., Li, J., Li, J., Liu, S., Huang, L. and Gao, W. 2017. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. Chinese Herbal Medicines, 9(2), 115-125. https://doi.org/10.1016/s1674-6384(17)60085-6

Wang, Y., Sun, X., Jia, X., Zhu, L. and Yin, H. 2021. Comparative transcriptomic of *Stevia rebaudiana* provides insight into rebaudioside D and rebaudioside M biosynthesis. Plant Physiology and Biochemistry, 167, 541-549. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.028

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

I. sonorae, *C. limetta*, and *B. media* phytoextracts and their antidiabetic potential

Fitoextractos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* y su potencial antidiabético

Iza F. Pérez-Ramírez[1], Julio C. Rubio-Rodríguez[1], Luis M. Salgado[2], Ofelia Mora[3], María L. González-Dávalos[3], Rosalía Reynoso-Camacho[1]*

[1] Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Las Campanas, Querétaro 76010, Querétaro. México.
[2] Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Cerro Blanco 141, Colinas del Cimatario, Querétaro 76090, Querétaro. México.
[3] Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro 76230, Querétaro. México.

ABSTRACT

In Mexican traditional medicine, several herbs are used for their potential antidiabetic effects. This study aimed to investigate the mechanisms underlying the antihyperglycemic effects of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media*. Aqueous extracts of these herbs demonstrated a consistent reduction in post-prandial blood glucose levels, in healthy rats during a starch oral tolerance test. Notably, *B. media* and *I. sonorae* exhibited significant *in vitro* inhibitory effects against alpha-amylase activity (20.5 and 25.4 %, respectively), while *B. media* enhanced glucose uptake in adipocytes by 4.0-fold, which was related to the overexpression of key genes involved in insulin signaling cascade including *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* (2.9-, 2.6-, and 3.2-fold, respectively). Furthermore, multivariate analysis highlighted that hydroxybenzoic acid hexoside and feruloylquinic acid were linked to their alpha-amylase inhibitory activity, while 17 distinct polyphenols were associated with the insulin mimetic activity. These findings propose a potential application of these herbs in the development of functional beverages with promising anti-diabetic attributes.

Keywords: Herbs; traditional medicine; adipocytes; glucose uptake; digestive enzymes; polyphenols.

RESUMEN

En la medicina tradicional mexicana, diferentes hierbas son utilizadas por su potencial efecto antidiabético. Este estudio tuvo como objetivo investigar los mecanismos subyacentes a los efectos antihiperglucémicos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media*. Los extractos acuosos de estas hierbas demostraron una consistente reducción en los niveles postprandiales de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia oral al almidón. Destacando que, los extractos de *B. media* e *I. sonorae* mostraron un efecto inhibitorio significativo *in vitro* contra la actividad de alfa-amilasa (20.5 y 25.4 %, respectivamente), mientras que *B. media* aumentó 4.0 veces la internalización de glucosa en adipocitos, lo cual fue relacionado con la sobreexpresión de genes claves involucrados en la cascada de señalización de la insulina incluyendo *Glut4, Irs1* y *Pi3k* (2.9, 2.6 y 3.2 veces, respectivamente). Además, el análisis multivariado resaltó que el ácido hidroxibenzoico hexódio y el ácido feruloilquínico fueron asociado con la actividad inhibitoria de alfa-amilasa, mientras que 17 polifenoles fueron asociados con la actividad mimética a la insulina. Estos hallazgos proponen la aplicación potencial de estas hierbas en el desarrollo de bebidas funcionales con prometedoras propiedades antidiabéticas.

Palabras clave: Hierbas; medicina tradicional; adipocitos; internalización de glucosa; enzimas digestivas; polifenoles.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is a prevalent metabolic disorder, affecting over 537 million people globally in 2021 according to the International Diabetes Federation (IDF). Hyperglycemia arises due to impaired carbohydrate digestion, glucose uptake, and insulin signaling. Herbal extracts, rich in polyphenolic compounds, offer potential for managing hyperglycemia by inhibiting carbohydrate-digesting enzymes and improving insulin sensitivity (Tran *et al*., 2020).

According to Mexican traditional medicine, *Citrus limetta* roots, *Ibervillea sonorae* roots, and *Briza media* leaves are consumed for diabetes control. Several scientific reports have previously demonstrated their hypoglycemic potential. A methanol extract of *C. limetta* fruit peel reduced blood glucose levels in diabetic rats, which was associated with its polyphenolic composition and antioxidant capacity (Flores-Fernández *et al*., 2017). The juice and aqueous extract of *I. sonorae* roots decreased blood glucose in healthy mice, and its dichloromethane extract showed a similar effect in alloxan diabetic mice (Alarcón-Aguilar *et al*., 2005). Similarly, glucose levels were reduced when rats were fed with a high fat and fructose diet and were treated with aqueous extract of *I. sonorae* roots, which was partly associated with its flavonoid content (Rivera-Ramírez *et al*., 2011). Zapata-Bustos *et al*. (2014) reported that an aqueous extract of *I. sonorae* roots induces glucose uptake in insulin-sensitive and insulin-resistant adipocytes. However, the mechanisms associated with the anti-diabetic effect of *I. sonorae* and *C. limetta* has not been identified. Regarding *B. media*, its aqueous extract

*Author for correspondence: Rosalía Reynoso-Camacho
e.mail: rrcamachomx@yahoo.com.mx
Received: April 10, 2024
Accepted: September 12, 2024
Published: October 17, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2308

is used for diabetes treatment but there is no evidence of its effectiveness (Lane *et al.*, 2006).

There is an increasing interest in the identification of polyphenol-rich sources for the development of functional beverages, which are the main application of the global polyphenol market, valued in in about 1.68 billion USD in 2022 (Grand View Research on polyphenols market). Therefore, the aim of this study was to identify the mechanisms associated with the hypoglycemic effect of *C. limetta*, *B. media* and *I. sonorae* aqueous extracts, via the evaluation of *in vitro* inhibitory activity against carbohydrate digestion enzymes and the modulation of key transcripts involved in the insulin signaling pathway in 3T3 L1 adipocytes, and to associate these beneficial health effects with their polyphenol profile through a chemometric analysis. These plants are analyzed in parallel due to their shared traditional use for diabetes management and their hypothesized similar hypoglycemic effects. By comparing these extracts, we aim to understand their distinct and potentially complementary mechanisms of action in controlling blood glucose levels, providing a comprehensive evaluation of their therapeutic potential.

MATERIAL AND METHODS

Herbal material and preparation of herbal aqueous extracts

Roots of *Ibervillea sonorae* and *Citrus limetta* roots, leaves and stems of *Briza media* were obtained from local markets in Querétaro, México, based on their traditional use in Mexican medicine for diabetes management. Extracts were prepared using two g of dried material in 100 mL of water and boiled for 30 min. This preparation method was chosen according to the recommendations of local herbalists to ensure traditional relevance. After boiling, all extracts were filtered using a 0.5 mm pore size filter and were stored at 4 ºC protected from the light.

Animal protocol experiments

Thirty male Wistar rats of 220 - 240 g were acquired from the Universidad Nacional Autónoma de México (Juriquilla, Querétaro, Mexico). The housing room was maintained at 23 ºC and 50 % relative humidity, under a 12 h light-dark cycle, animals were housed individually with free access to standard diet (La Rodent Diet 5001) and water. Experiments were performed in accordance with the Animal Care and Use Protocol (NOM-062-ZOO-1999), and protocol was approved by the Bioethics Committee, Faculty of Natural Sciences of the Universidad Autónoma de Querétaro (Querétaro, México; approval number: 5FCN2015).

Oral starch tolerance test

After one week of acclimatization, rats were fasted for 12 h and then randomly allocated in five groups of six rats each. The negative control group was administered water (vehicle) via intragastric cannulation, the positive control group was administered acarbose (10 mg/kg b.w.), and the treatment groups were administered each herbal extract: *I. sonorae*, C. *limetta*, and *B. media* (6 mL/kg b.w.). This concentration of herbal extracts was based on previous studies conducted by our research group, which demonstrated effective results in similar experimental settings (Hernández-Saavedra *et al*., 2016). After 5 min, a starch solution (5 g/kg b.w.) was administered to all rats. Glucose was measured at 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min., using blood obtained from the tail vein with an Accu-Chek System (Roche Diagnosis, Germany).

Evaluation of *in vitro* α-amylase and α-glucosidase enzymes inhibitory activity

Herbal extracts were evaluated against α-amylase and α-glucosidase according to the methods described by Apostolidis *et al.* (2007). Results were reported as percentage of inhibition.

Cell culture

3T3-L1 preadipocytes (1 x 104 cells) were cultured until confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco by Life Technologies, New York, USA) and 1 % penicillin/streptomycin (Invitrogen). The differentiation of adipocytes was induced with 5 µg/mL insulin (Life Technologies), 0.25 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 0.5 mM IBMX (Invitrogen), 2 % FBS, and 1 % penicillin/streptomycin in DMEM for 2 days. Then, the medium was replaced with DMEM with 5 µg/mL insulin, 2 % FBS, and 1 % penicillin/streptomycin for 1 day. Finally, the medium was replaced with DMEM with 2 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin for 4 days. Mediums were changed every two days during adipocytes proliferation and differentiation.

In vitro glucose uptake assay

Differentiated cells were serum-starved for 4 h and were treated with 0.5 and 1.0 mg/mL of lyophilized herbal extracts dissolved in 0.1 % dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). This concentration of herbal extracts was based on previous studies conducted by our research group, which demonstrated effective results in similar experimental settings (Pérez-Ramírez *et al*., 2017). Negative control cells were incubated with 0.1 % DMSO, whereas positive control cells were incubated with 100 nM of insulin. Glucose uptake assays were performed as described previously by Urso *et al*. (1999). Cells were incubated at 37 ºC for 30 min. Glucose concentration was determined using colorimetric-commercial kit (Spinreact, Girone, Spain). All experiments were assessed in triplicate.

Relative quantification of *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* gene transcripts

As in glucose uptake assay, fully differentiated adipocytes were incubated at 37 ºC for 30 min with each treatment. Afterwards, cells were lysed with 1 mL of Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA) for the isolation of total RNA according to the instructions of manufacturer. RNA was quantified with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Ther-

mo Fisher Scientific). RNA quality was assessed with 260/280 and 260-230 ratios, whereas RNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1 % denaturing agarose gel.

The cDNA synthesis was carried out with 1 µg of total RNA, 4 µL of M-MLV 5X reaction buffer (Invitrogen, Ca, USA), 1 µL of 5 µM oligo dT (Invitrogen), 1 µL of 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 1 µL (200 U) of M-MLV RT (Invitrogen), 3 µL of 0.1 M DTT (Invitrogen), 1 µL of RNase inhibitor (Invitrogen), and RNAse-free water (Sigma-Aldrich), reaching a final volume of 20 µL. The reaction was incubated at 42 °C for 50 min and was stopped by incubating at 70 °C for 15 min.

The RT-PCR reaction was carried out with Sybr Green qPCR master mix (Thermo Scientific) according to the instructions of the manufacturer using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems. California, USA). Target transcripts were amplified using the following primers: *Glut4*: sense 5′-TCATCAGGATAAACAGCAG-3′ and antisense 5′-TACTATTGTGTTCCTTTGC-3′, *Pi3k*: sense 5′-CATGTTCTGGAAACTTCACCA-3′ and antisense 5′CCTGGGGAAACATAAACTTG-3′, and *Irs1*: sense 5′-CCTCACAGTCTTCAGTGGCT-3′ and antisense 5′-ATAGTCCCCATTTCCTTTGC-3′. Gene expression was assessed in duplicate. Relative quantification was carried out with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using *Actin* (sense 5′- GCTACAGCTTCACCACCACA-3′ and antisense 5′- AGTTTCATGGATGCCACAGG-3′) and *18S* (sense 5′- GGAGCGATTTGTCTGGGTTA-3′ and antisense 5′- GTAGGGTAGGCACACGCTGA-3′) as reference genes.

Polyphenol profile

The polyphenol profile was assessed by Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to a Quadrupole-Time of Flight (QTOF) with an atmospheric pressure Electrospray Ionization (ESI) interphase (Vion, Waters Co, MA, USA). The column used was an Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) using the conditions reported previously by Rodríguez-Gonzalez *et al.* (2018). Data acquisition was carried out with UNIFI Scientific Information System (Waters Co). Polyphenols were identified by comparison of elemental composition with the exact mass of the pseudo molecular ion (error mass < 5 ppm) using Phenol-Explorer database (http://phenol-explorer.eu), analysis of fragmentation pattern and isotopic distribution. The high-resolution mass spectra of the main polyphenols identified in the herbal extracts are shown in Figures 1S-9S.

Data analysis

Statistical significance was evaluated using ANOVA followed by Dunnet's test ($p < 0.05$). Identification of polyphenols linked to the extracts' antidiabetic potential was assessed by Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) and Variable Importance in the Projection (VIP) vs Coefficient score plots. JMP software (v11.0, SAS Institute, NC, USA) facilitated all statistical analyses.

RESULTS

Effect of herbal extracts on glucose absorption

Blood glucose levels peaked at 30 min after ingesting 5 g/kg of starch under fasting conditions (Figure 1). *C. limetta* extract slightly reduced the hyperglycemic peak (0.12-fold), while *B. media* and *I. sonorae* decreased ($p < 0.05$) postprandial glucose levels by 0.34 - 0.36-fold. This hints a mild postprandial antihyperglycemic activity. *In vitro* tests demonstrated that *I. sonorae* and *B. media* had the highest inhibitory α-amylase activity (25.4 and 20.5 %, respectively) as compared to *C. limetta* (5.3 %) (Table 1). Acarbose exerted even greater inhibitory activity (88.1 %). For α-glucosidase, *C. limetta* and *B. media* showed similar low inhibition (5.1 and 4.4 %, respectively), while *I. sonorae* lacked this effect.

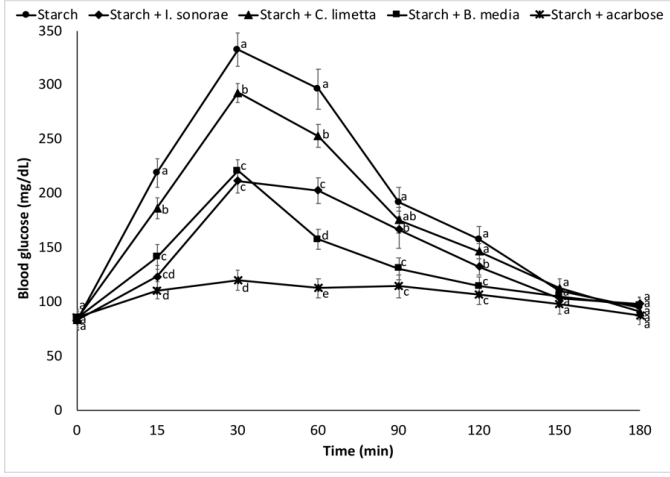


Figure 1. Effect of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts on postprandial blood glucose after a starch load (5 g/kg b.w.) in healthy Wistar rats. Data are shown as mean values (n = 6) and error bars represent standard error. Different letters in the same experimentation time indicate significant ($p < 0.05$) differences by Tukey's test.

Figura 1. Efecto de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* sobre la glucosa postprandial en sangre tras una carga de almidón (5 g/kg de peso corporal) en ratas Wistar sanas. Los datos son mostrados como media (n = 6) y las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes en el mismo tiempo experimental indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con la prueba de Tukey.

Effect of herbal extracts on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes

All herbal extracts increased ($p < 0.05$) glucose uptake as compared to control cells (Figure 2). *C. limetta* and *I. sonorae*

Table 1. *In vitro* inhibitory activity of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts against carbohydrates digestive enzymes.

Tabla 1. Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* contra enzimas de digestión de carbohidratos.

Herbal extracts	α-Amylase inhibition	α-Glucosidase inhibition
I. sonorae	25.4 ± 0.3b	ND
C. limetta	5.3 ± 0.5	5.1 ± 0.5b
B. media	20.5 ± 2.0c	4.4 ± 0.4b
Acarbose	88.1 ± 6.3a	81.9 ± 6.6a

Values are expressed as maximum percentage of inhibition (%). Data are expressed as mean values ± standard deviation (n = 3). Means within a column followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) by Tukey's test. ND: not detected.Los valores están expresados como porcentaje máximo de inhibición (%). Los datos son presentados como media ± desviación estándar (n = 3). Las medias dentro de una columna seguida de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey. ND: no detectado.

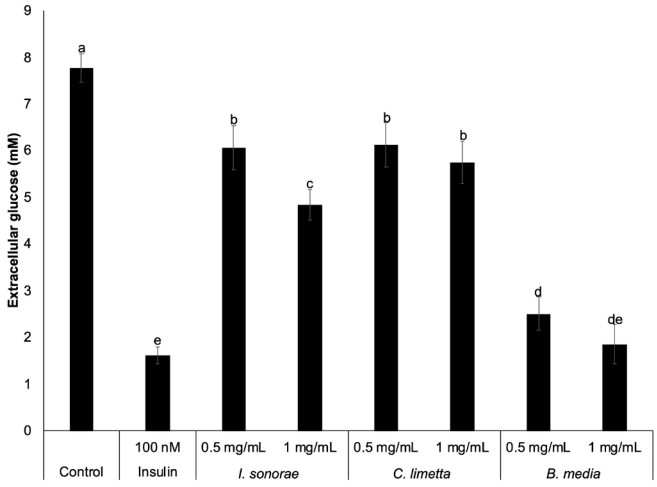


Figure 2. Effect of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts on glucose uptake in 3T3 L1 adipocytes. Data are showed as mean values (n = 3) and error bars represent standard error. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Figura 2. Efecto de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* sobre la internalización de glucosa en adipocitos 3T3 L1. Los datos son mostrados como media (n = 3) y las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey.

led to lower extracellular glucose levels (0.22-0.38-fold) as compared to the control group. Remarkably, *B. media* significantly reduced extracellular glucose levels (0.68-0.76-fold) at both concentrations, comparable to effect of insulin at the highest *B. media* concentration (1.0 mg/mL). *B. media* extract induced significant overexpression of *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* genes (2.27-2.85, 1.98 - 2.60, and 2.51 - 3.19-fold, respectively) as compared to control cells, showcasing a dose-response relationship (Figure 3).

Polyphenol profile of herbal extracts

A comprehensive analysis of the polyphenol profiles was conducted (Table 2). *I. sonorae* had 31 identified phenolic compounds, including eight hydroxybenzoic acids, twelve hydroxycinnamic acids, three flavanones, six flavonols, and two hydroxycoumarins. *C. limetta* roots extract had 39 phenolic compounds, including eleven hydroxybenzoic acids, twenty hydroxycinnamic acids, one flavanol, four flavanones, two flavonols, and one hydroxycoumarin. *B. media* contained 28 identified polyphenols, including twelve hydroxybenzoic acids, ten hydroxycinnamic acids, one flavanol, four flavanones, three flavonols, and two hydroxycoumarins. Multivariate analyses linked phenolic compounds to the previously described antidiabetic potential. *I. sonorae* and *B. media* extracts showed the highest *in vitro* α-amylase inhibitory activity (Table 1), which was linked mainly to hydroxybenzoic acid hexoside (PA_5), feruloylquinic acid (PA_24), and benzoic acid (PA_10) (Figure 4). Accordingly, these compounds were most abundant in these extracts (Table 2).

Eighteen polyphenols were associated with reduced glucose uptake (Figure 5): dihydroxybenzoic acid isomer I (PA_4), hydroxybenzoic acid isomer II (PA_7), rosmarinic acid (PA_36), protocatechuic acid (PA_8), dihydroxybenzoic acid isomer II (PA_9), caffeoylquinic acid isomer II (PA_21), hydroxybenzoic acid isomer I (PA_3), ellagic acid (PA_29), quercetin (F_17), naringin malonate (F_7), kaempferol hexoside-rhamnoside (F_13), narirutin (F_3), kaempferol sophoroside (F_12), naringenin (F_8), esculetin (C_3), hydroxycoumarin (C_4), and psoralen (C_1). These polyphenols were found in greater amount in *B. media* (Table 2), which exerted the greatest effect on glucose uptake in adipocytes (Figure 2). Additionally, eighteen polyphenols were linked to *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* gene overexpression. Seventeen of these were also associated with an increase in glucose uptake of *B. media* (Fig. 5B), while sinapoylquinic acid isomer II (PA_32) was linked solely to gene overexpression in the insulin cascade pathway, not increased glucose uptake.

DISCUSSION

In summary, our study deepens into the anti-diabetic potential of three traditionally used herbal extracts (*I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media*) to elucidate their mechanisms of action and the associated polyphenols. Our findings align with the accumulated evidence of the role of polyphenols in metabolic disorders, particularly diabetes, beyond their antioxidant and anti-inflammatory properties. We adopted an *in vitro* multi-pronged approach to assess their mechanisms, focusing on their impact on glucose absorption and uptake.

Regarding glucose intestinal absorption, all extracts significantly mitigated postprandial hyperglycemia, with *B. media* and *I. sonorae* extracts exhibiting the most pronounced effects. This anti-hyperglycemic activity was particularly linked to their a-amylase inhibitory activity, an enzyme pivotal in starch digestion. In this regard, it has been previously reported that *C. limetta* peel extract inhibits α-amylase activity (Padilla-Camberos *et al*., 2014).

Notably, polyphenols such as hydroxybenzoic acid hexoside, benzoic acid, and feruloylquinic acid were key contributors to these effects, which can inhibit competitively or allosterically these digestive enzymes (Şöhretoğlu *et al*., 2023). Accordingly, it has been previously reported that an extract of phenolic compounds from green coffee beans, rich in feuroylquinic acids and caffeoylquinic acids, inhibited α-amylase activity (Cheng *et al*., 2019).

The second facet of our research, glucose uptake in 3T3 L1 adipocytes, produced interesting outcomes. *B. media* emerged as a potent inducer of glucose uptake, exerting a similar effect to insulin. These results suggest the insulin-mimetic potential of *B. media*, which was associated with the over-expression of *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* genes, all critical elements in the insulin signaling cascade. This enhanced glucose uptake and expression of key genes in adipocytes is particularly valuable in the context of insulin resistance, a common characteristic of type 2 diabetes mellitus. Zapata-Bustos *et al.* (2014) reported that the extract of *I. sonorae* stimulates the glucose uptake in 3T3-F442A and 3T3-L1 adipocytes in a concentration-dependent manner, whereas this is the first study that reports this hypoglycemic mechanism for *C. limetta* roots and the *B. media* plant.

Table 2. Polyphenol profile of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts by UPLC-QTOF MS^E.
Tabla 2. Perfil de polifenoles de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* por UPLC-QTOF MS^E.

Code	Polyphenols	Rt (min)	Molecular Formula	Expected mass (Da)	Observed mass (Da)	Mass error (ppm)	*I. sonorae*	*C. limetta*	*B. media*
	Hydroxybenzoic acids								
PA_1	Hydroxybenzoic acid isomer I	1.22	C7H6O3	138.0317	138.0312	-3.3747	1293.3	1772.8	620.4
PA_2	Protocatechuic acid hexoside	1.63	C13H16O9	316.0794	316.0790	-1.4622	21512.3	347697.0	5984.6
PA_3	Vanillic acid†	1.70	C8H8O4	168.0423	168.0417	-3.2769	ND	26039.5	51512.0
PA_4	Dihydroxybenzoic acid isomer I	1.94	C7H6O4	154.0266	154.0266	-0.1933	668.5	446.8	20571.0
PA_5	Hydroxybenzoic acid hexoside	2.20	C13H16O8	300.0845	300.0834	-3.6896	3536.4	487.7	3027.3
PA_6	Gallic acid ethyl ester	2.36	C9H10O5	198.0528	198.0523	-2.5838	ND	96098.1	20600.6
PA_7	Hydroxybenzoic acid isomer II	3.13	C7H6O3	138.0317	138.0315	-1.4297	1614.8	966.4	87775.5
PA_8	Protocatechuic acid†	3.32	C7H6O4	154.0266	154.0259	-4.5348	853.3	444.1	1993.8
PA_9	Dihydroxybenzoic acid isomer II	4.21	C7H6O4	154.0266	154.0259	-4.7078	ND	ND	506.4
PA_10	Benzoic acid	4.27	C7H6O2	122.0358	122.0368	0.3424	2721.0	829.1	1300.0
PA_11	Syringic acid†	4.48	C9H10O5	198.0528	198.0523	-2.5853	ND	16507.5	11358.3
PA_12	Hydroxybenzoic acid isomer III	6.67	C7H6O3	138.0317	138.0316	-0.3344	489.8	3217.6	1763.7
	Hydroxycinnamic acids								
PA_13	Caffeoyl tartaric acid	1.08	C13H12O9	312.0481	312.0475	-1.9704	ND	938.1	ND
PA_14	Cinnamic acid†	1.45	C9H8O2	148.0524	148.0519	-3.6684	3911.7	ND	ND
PA_15	Caffeoylquinic acid isomer I	2.57	C16H18O9	354.0951	354.0954	0.8135	6010.1	450.2	ND
PA_16	Caffeic acid ethyl ester	3.52	C11H12O4	208.0736	208.0731	-2.1574	ND	2734.5	ND
PA_17	Coumaroylquinic acid isomer I	3.68	C16H18O8	338.1002	338.1005	1.0962	ND	747.8	ND
PA_18	Ferulic acid†	3.68	C10H10O4	194.0579	194.0576	-1.8077	ND	2984.7	ND
PA_19	Ferulic acid hexoside	3.69	C16H20O9	356.1107	356.1107	-0.1713	ND	8275.5	394.7
PA_20	Coumaroyl hexose	4.09	C15H18O8	326.1002	326.0996	-1.7866	1237.7	1070.8	ND
PA_21	Caffeoylquinic acid isomer II	4.17	C16H18O9	354.0951	354.0943	-2.0983	1451.5	999.5	10313.2
PA_22	Coumaroyl glycolic acid	4.45	C11H10O5	222.0528	222.0523	-2.4526	ND	879.9	5151.3
PA_23	Ellagic acid hexoside	4.73	C20H16O13	464.0591	464.0602	2.3819	ND	690.2	ND
PA_24	Feruloylquinic acid	5.12	C17H20O9	368.1107	368.1103	-1.1118	1715.0	ND	1050.0
PA_25	Coumaric acid†	5.18	C9H8O3	164.0473	164.0472	-0.8242	613.7	1563.4	780.1
PA_26	Sinapoylquinic acid isomer I	5.23	C18H22O10	398.1213	398.1200	-3.3438	ND	446.0	ND
PA_27	Ellagic acid pentoside	5.32	C19H14O12	434.0485	434.0492	1.4832	ND	2870.2	ND
PA_28	Coumaroylquinic acid isomer II	5.34	C16H18O8	338.1002	338.0999	-0.7703	ND	502.8	369.2
PA_29	Ellagic acid†	5.63	C14H6O8	302.0063	302.0067	1.2807	ND	1194.1	1477.4
PA_30	Isoferulic acid	5.73	C10H10O4	194.0579	194.0576	-1.8164	539.7	4217.5	2327.3
PA_31	Dicaffeoylquinic acid isomer I	6.29	C25H24O12	516.1268	516.1257	-2.0080	72712.9	2850.5	ND
PA_32	Sinapoylquinic acid isomer II	6.36	C18H22O10	398.1213	398.1231	4.6479	ND	1554.8	1459.7
PA_33	Dicaffeoylquinic acid isomer II	6.39	C25H24O12	516.1268	516.1260	-1.5250	28039.8	1634.2	2519.1
PA_34	Caffeoylquinic acid isomer III	6.40	C16H18O9	354.0951	354.0947	-0.9726	4404.7	ND	ND
PA_35	Dicaffeoylquinic acid isomer III	6.73	C25H24O12	516.1268	516.1272	0.8322	75354.8	2355.7	ND
PA_36	Rosmarinic acid†	6.82	C18H16O8	360.0845	360.0841	-1.1864	586.0	ND	1831112.9
	Flavanols								
F_1	(Epi)-catechin hexose	5.20	C21H24O11	452.1319	452.1328	2.0200	ND	1731.3	678.3
	Flavanones								
F_2	Neoeriocitrin	4.50	C27H32O15	596.1741	596.1736	-0.8151	679.8	802.3	ND
F_3	Narirutin	6.37	C27H32O14	580.1792	580.1788	-0.7378	ND	ND	5223.6
F_4	Naringin†	6.57	C27H32O14	580.1792	580.1796	0.6403	ND	190414.1	ND
F_5	Hesperidin†	6.76	C28H34O15	610.1898	610.1892	-0.9442	ND	662410.3	1141.0
F_6	Eriodictyol	7.73	C15H12O6	288.0634	288.0636	0.5717	191.1	ND	ND
F_7	Naringin malonate	8.03	C36H44O22	828.2324	828.2318	-0.7540	ND	ND	788.0
F_8	Naringenin†	8.68	C15H12O5	272.0685	272.0686	0.3929	816.7	724.7	917.0
	Flavonols								
F_9	Myricetin rutinoside	5.17	C27H30O17	626.1483	626.1494	1.6816	358.1	ND	ND
F_10	Rhamnetin hexoside	5.25	C22H22O12	478.0747	478.0757	2.1079	391.5	ND	ND
F_11	Myricetin hexoside	5.27	C21H20O13	480.0904	480.0905	0.1751	2583.4	3125.6	ND
F_12	Kaempferol sophoroside	5.72	C27H30O16	610.1534	610.1535	0.1290	ND	ND	5046.0
F_13	Kaempferol hexoside-rhamnoside	5.86	C27H30O15	594.1585	594.1605	3.4310	ND	ND	1449.4
F_14	Quercetin hexoside	5.90	C21H20O12	464.0955	464.0953	-0.4036	16498.3	735.0	ND
F_15	Quercetin malonyl-hexoside	6.18	C24H22O15	550.0959	550.0948	-2.0132	246.8	ND	ND
F_16	Kaempferol malonyl-hexoside	6.75	C24H22O14	534.1010	534.0992	-3.2217	402.2	ND	ND
F_17	Quercetin†	7.90	C15H10O7	302.0427	302.0422	-1.5475	ND	ND	431.4
	Furanocoumarins								
C_1	Psoralen	6.92	C11H6O3	186.0317	186.0320	1.3986	ND	ND	29060.3
	Hydroxycoumarins								
C_2	Esculin	3.20	C15H16O9	340.0794	340.0786	-2.5525	1690.6	1427.8	ND
C_3	Esculetin	4.06	C9H6O4	178.0266	178.0260	-3.3713	403.6	ND	26338.5
C_4	Hydroxycoumarin	6.82	C9H6O3	162.0317	162.0318	0.7271	ND	ND	112663.3

Results are expressed as arbitrary units. Data are shown as mean values (n = 3). Rt: retention time; ND: not detected; PA: phenolic acids; F: flavonoids; C: coumarins. †Identification confirmed with commercial standards.
Los resultados están expresados como unidades arbitrarias. Los datos son mostrados como media (n = 3). Rt: tiempo de retención; ND: no detectado; PA: ácidos fenólicos; F: flavonoides; C: cumarinas. †Identificación confirmada con estándares comerciales.

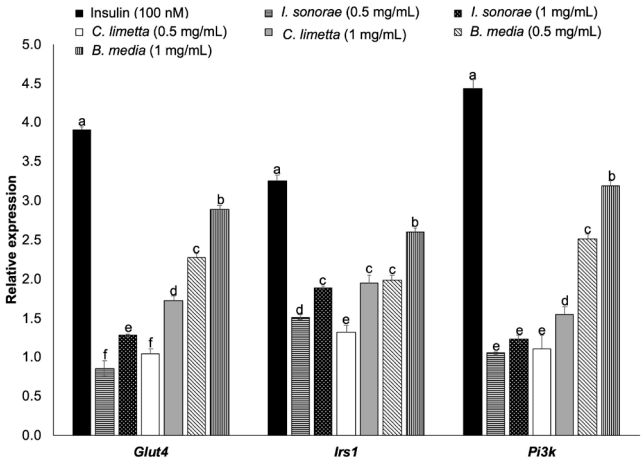


Figure 3. Effect of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media aqueous* extracts on *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* relative expression in 3T3 L1 adipocytes. Relative expression was estimated in comparison with negative control cells. Data are showed as mean values (n = 3) and error bars represent standard error. Different letters for each gene indicate significant differences ($p < 0.05$) by Tukey's test. *Glut4*: glucose transporter type 4, *Irs1*: insulin receptor substrate-1, *Pi3k*: phosphatidylinositol 3-kinase.

Figura 3. Efecto de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* sobre la expresión relativa de *Glut4*, *Irs1* y *Pi3k* en adipocitos 3T3 L1. La expresión relativa fue estimada en comparación con las células de control negativo. Los datos son mostrados como media (n = 3) y las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes para cada gen indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey. *Glut4*: transportador de glucosa tipo 4, *Irs1*: sustrato del receptor de insulina 1; *Pi3k*: fosfatidilinositol 3-quinasa.

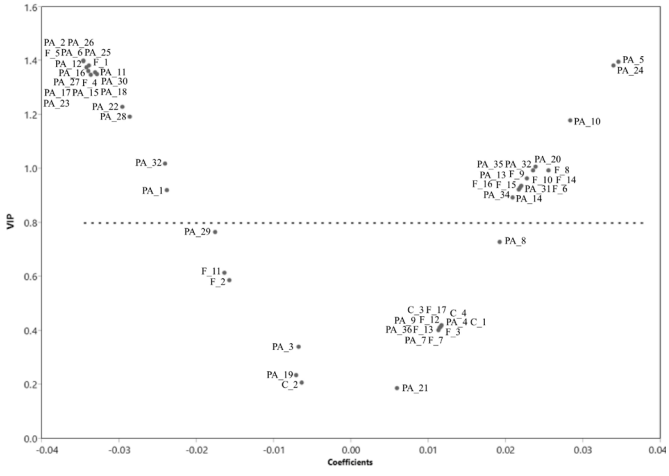


Figure 4. Association between the polyphenol profile of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts and their antidiabetic potential assessed by α-amylase inhibitory activity. VIP: variable importance in the projection.

Figura 4. Asociación entre el perfil de polifenoles de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* y su potencial antidiabético determinado por la actividad inhibitoria de α-amilasa. VIP: importancia de la variable para la proyección.

Our detailed multivariate analysis suggested several polyphenols associated with the observed effects, some of which have been previously reported to impact glucose uptake and insulin signaling. For instance, it has been reported that rosmarinic acid (Vlavcheski *et al*., 2017), naringin (Dayarathne *et al*., 2021), ellagic acid (Kábelová *et al*., 2021) and kaempferol (Moore *et al*., 2023) increase glucose uptake

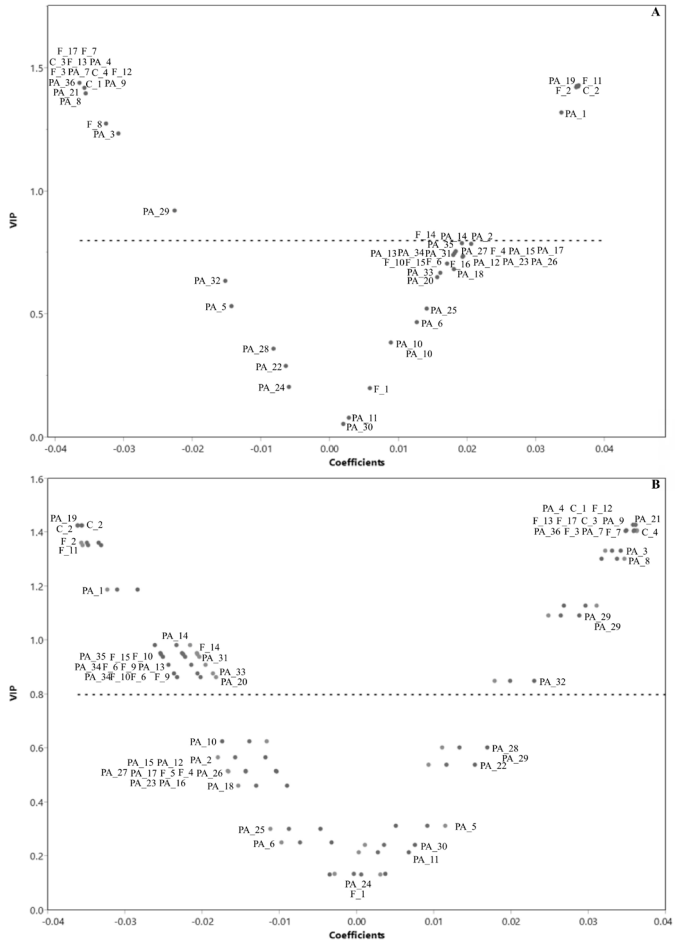


Figure 5. Association between the polyphenol profile of *I. sonorae*, *C. limetta*, and *B. media* aqueous extracts and their antidiabetic potential assessed in 3T3 L1 adipocytes by glucose uptake (A) and the relative expression of *Glut4*, *Irs1*, and *Pi3k* (B). *Glut4*: glucose transporter type 4, *Irs1*: insulin receptor substrate-1, *Pi3k*: phosphatidylinositol 3-kinase, VIP: variable importance in the projection.

Figura 5. Asociación entre el perfil de polifenoles de extractos acuosos de *I. sonorae*, *C. limetta* y *B. media* y su potencial antidiabético determinado por la internalización de glucosa en adipocitos 3T3 L1 (A) y la expresión relativa de *Glut4*, *Irs1* y *Pi3k* (B). *Glut4*: transportador de glucosa tipo 4, *Irs1*: sustrato del receptor de insulina 1; *Pi3k*: fosfatidilinositol 3-quinasa; VIP: importancia de la variable para la proyección.

in skeletal muscle cells and adipocytes. Protocatechuic acid is an hydroxybenzoic acid which stimulates insulin signaling pathways in myocytes, hepatocytes and adipocytes. Specifically, this phenolic acid significantly increased the expression and protein level of IRS-1 and GLUT4 in insulin resistant adipocytes (Shakoor *et al*., 2023).

Numerous studies have reported the ability of polyphenols to increase insulin-dependent glucose uptake via GLUT4 activation by up-regulating *Pi3k* expression (Williamson and Sheedy, 2020). Chlorogenic acid and quercetin promote glucose uptake by increasing *Glut4* mRNA levels and its translocation to cell membrane (Gannon *et al*., 2014). Raciti *et al.* (2018) evaluated a citrus extract rich in hesperidin and narirutin in adipocytes 3T3-L1 and reported increased *Glut4* mRNA levels; however, the administration of the isolated compounds did not show the same effect, suggesting a

synergistic mechanism. Altogether, these results further credence to the notion that polyphenols play a pivotal role in the mechanisms behind the anti-diabetic effects of herbal extracts.

CONCLUSIONS

This study identifies the mechanism underlying the potential glucose-regulating properties of *B. media* and *I. sonorae*, suggesting their viability as anti-diabetic agents in traditional medicine or as ingredients for functional beverages. Furthermore, the identification of polyphenols associated with these effects adds to the growing evidence highlighting the potential of these natural compounds in mitigating metabolic disorders, offering a promising opportunity for the development of novel therapeutic strategies. Further investigations are warranted to validate the impact of these herbal extracts on insulin resistance and glucose intolerance through intervention studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Chemistry Faculty of the Universidad Autónoma de Querétaro for providing facilities for the UPLC-QTOF analysis (CONACyT project number: INFR-15-255182). This work was supported by Fondos Mixtos de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Querétaro (Grant no. 2012-CO1-193469).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no actual or potential conflict of interests, including financial, personal or relationship with other organizations.

REFERENCES

Alarcón-Aguilar, F.J., Calzada-Bermejo, F., Hernandez-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C. and Roman-Ramos, R. 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II. Journal of Ethnopharmacology. 97: 447-452.

Apostolidis, E., Kwon, Y.I. and Shetty, K. 2007 Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 8: 46-54.

Cheng, K., Wenjiang, D., Long, Y., Zhao, J., Hu, R., Zhang, Y. and Zhu, K. 2019. Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and *in vitro* digestion of green coffee beans. Food Science & Nutrition. 7: 1084-1095.

Dayarathne, L.A., Ranaweera, S.S., Natraj, P., Rajan, P., Lee, Y.J. and Han, C.H. 2021. The effects of naringenin and naringin on the glucose uptake and AMPK phosphorylation in high glucose treated HepG2 cells. Journal of Veterinary Science, 22: e92.

Flores-Fernández, J., Barragán-Álvarez, C., Díaz-Martínez, N., Villanueva-Rodríguez, S. and Padilla-Camberos, E. 2017. *In vitro* and *in vivo* postprandial glycemic activity of *Citrus limetta* peel flour. Pharmacognosy Magazine. 13: 613-616.

Gannon, N., Conn, C. and Vaughan, R. 2014. Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: a mini-review. Molecular Nutrition & Food Research. 59: 48-64.

Hernández-Saavedra, D., Pérez-Ramírez, I.F., Ramos-Gómez, M., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Pina, G. and Reynoso-Camacho, R. 2016. Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. Medicinal Chemistry Research. 25: 163-172.

Kábelová, A., Malínská, H., Marková, I., Oliyarnyk, O., Chylíková, B. and Šeda, O. 2021. Ellagic acid affects metabolic and transcriptomic profiles and attenuates features of metabolic syndrome in adult male rats. Nutrients. 13: 804.

Lane, J., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E. and Martinez, A. 2006. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. Phytotherapy Research. 20: 250-255.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods. 25: 402-408.

Moore, W.T., Luo, J. and Liu, D. 2023. Kaempferol improves glucose uptake in skeletal muscle via an AMPK-dependent mechanism. Food Science and Human Wellness. 12: 2087-2094.

Padilla-Camberos, E., Lazcano-Díaz, E., Flores-Fernandez, J.M., Owolabi, M.S., Allen, K. and Villanueva-Rodríguez, S. 2014. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes, the antioxidant activity, and the polyphenolic content of *Citrus limetta* peel extract. The Scientific World Journal. 2014: 121760.

Pérez-Ramírez, I.F., González-Dávalos, M.L., Mora, O., Gallegos-Corona, M.A. and Reynoso-Camacho, R. 2017. Effect of *Ocimum sanctum* and *Crataegus pubescens* aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism. Journal of Functional Foods. 35: 24-31.

Raciti, G.A., Fiory, F., Campitelli, M., Desiderio, A., Spinelli, R., Longo, M., Nigro, C. and Miele, C. 2018. *Citrus aurantium* L. dry extracts promote *C/ebpβ* expression and improve adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. PloS One. 13: e0193704.

Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G.N., Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C. and Paniagua-Castro, N. 2011. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. Journal of Biotechnology and Biomedicine. 2011: 968984.

Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S., Rodríguez-García, M.E., Reynoso-Camacho, R. 2018. Improvement of physico-chemical properties and phenolic compounds bioavailability by concentrating dietary fiber of peach (*Prunus persica*) juice by-product. Journal of the Science of Food and Agriculture. 98: 3109.

Shakoor, H., Hussein, H., Al-Hassan, N., Alketbi, M., Kizhakkayil, J. and Platat, C. 2023. The muscle-conditioned medium containing protocatechuic acid improves insulin resistance by modulating muscle communication with liver and adipose tissue. International Journal of Molecular Sciences. 24: 9490.

Şöhretoğlu, D., Renda, G., Arroo, R., Xiao, J. and Sari, S. 2023. Advances in the natural α-glucosidase inhibitors. eFood. 4: e112.

Urso, B., Cope, D., Kallo, H., Hayward, A., Whitehead, J., O'Rahilly, S. and Siddle, K. 1999. Differences in signaling properties of the cytoplasmic domains of the insulin receptor and insulin-

like growth factor receptor in 3T3-L1 adipocytes. Journal of Biological Chemistry. 274: 30864-30873.

Tran, N., Pham, B. and Le, L. 2020. Bioactive compounds in anti-diabetic plants: from herbal medicine to modern drug discovery. Biology. 9: 252.

Vlavcheski, F., Naimi, M., Murphy, B., Hudlicky, T. and Tsiani, E. 2017. Rosmarinic acid, a rosemary extract polyphenol, increases skeletal muscle cell glucose uptake and activates AMPK. Molecules, 22: 1669.

Williamson, G. and Sheedy, K. 2020. Effects of polyphenols on insulin resistance. Nutrients. 12: 3135.

Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, A., Gómez-Sánchez, M. and Salazar-Olivo, L. 2014. *Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. Journal of Ethnopharmacology. 28: 546-52.

Biotecnia
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

UV-C effect on postharvest quality of citrus fruits from the northeastern region of Valle del Cauca, Colombia

Efecto de la UV-C en la calidad postcosecha de cítricos de la región nororiente del Valle del Cauca, Colombia

Julián Acevedo-Daza[1], Jorge Andrés Villegas-Ciro[1], Valentina Pineda-Sepulveda[1], Juan Camilo Jaramillo-González[1], Viviana Restrepo-Cubillos[1], Jessica Tatiana Peña-García[1], José Hernán Soto-Bastidas[1], Liseth Tatiana Buitrago-Pinilla[1], Johanna Valentina Arroyo-Merino[1], Diana Carolina Ñañez-Palacio[1], Diego Fernando Castro-Vargas[1], Esteban Largo-Ávila[1], and Alba Mery Garzón-García[1] *

[1] Tecnología Agroambiental, Universidad del Valle – Sede Regional Caicedonia. Caicedonia, Valle del Cauca, Colombia. Carrera 14 No. 4 - 48. CP 762540.

ABSTRACT

Ultraviolet short wave (UV-C) irradiation is an emerging technology employed in postharvest fruits treatment. This method facilitates a reduction in microbial load, triggers an elicitor effect, and prolongs the shelf life of fruits. The aim of this research was to assess the impact of UV-C treatment on the physicochemical parameters, morphology, and surface color of the primary citrus fruits cultivated in the northeastern region of Valle del Cauca, Colombia. Fruits of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange cv. 'Sweety' were irradiated with UV-C for 5 min. A positive control involved samples treated with a 150 mg/L sodium hypochlorite solution for 5 min, while the negative control comprised samples without any postharvest treatment. Subsequently, the fruits were stored in plastic baskets for 21 d at 26 °C with a relative humidity of 70 %. The results revealed that UV-C application effectively delayed maturation, prevented granulation, and maintained the physicochemical parameters, morphology, and surface color of citrus fruits during storage. In conclusion, UV-C shows promise as a technology for treating citrus fruits during the postharvest stage, offering a means to mitigate losses, and assuring food availability.

Keywords: Fruit irradiation; ultraviolet short wave; storage at room temperature; physicochemical analyses; color measurement.

RESUMEN

La irradiación con ultravioleta de onda corta (UV-C) es una tecnología emergente empleada en la postcosecha de frutas. Este método facilita la reducción de la carga microbiana, genera un efecto elicitor, y prolonga la vida útil de frutas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el impacto del tratamiento UV-C sobre los parámetros fisicoquímicos, morfología y color de la superficie de los principales cítricos cultivados en la región nororiental del Valle del Cauca, Colombia. Los frutos de limón mandarino, limón Tahití y naranja dulce 'Sweety' fueron irradiados con UV-C por 5 min. Un control positivo incluyó muestras tratadas con una solución de hipoclorito de sodio de 150 mg/L durante 5 minutos, mientras que el control negativo incluyó muestras sin ningún tratamiento postcosecha. Posteriormente, los frutos se almacenaron en cestas plásticas durante 21 d a 26 °C con una humedad relativa del 70 %. Los resultados revelaron que la UV-C retrasó la maduración, previno la granulación, y mantuvo parámetros fisicoquímicos, morfológicos, y el color superficial de los cítricos durante su almacenamiento. En conclusión, la UV-C se mostró como una tecnología prometedora para el tratamiento de cítricos durante la postcosecha, disminuyendo pérdidas y asegurando la disponibilidad de alimentos.

Palabras clave: Irradiación de frutas; ultravioleta de onda corta; almacenamiento a temperatura ambiente; análisis fisicoquímicos; medición de color.

INTRODUCTION

Citrus fruits, members of the *Rutaceae* family, are primarily consumed fresh or used as raw materials for juices, due to their sensory qualities such as color, bitterness, and astringency. They are also rich in vitamin C and various secondary metabolites, including flavonoids, limonoids, carotenoids, phenolic acids, and essential oils. Additionally, they provide essential micronutrients like sugars, dietary fiber, and minerals (Lv et *al.*, 2015). Globally, citrus fruits are the second most produced fruit, among them, oranges are the most significant, followed by tangerines, limes, and lemons. China, Brazil, and India are the leading producers of citrus fruits (Pereira Gonzatto and Scherer Santos, 2023). In Colombia, citrus production reaches up to 600,000 tons annually, with the northeastern region of Valle del Cauca, particularly Caicedonia and Sevilla, contributing about 7,000 tons per year (Agronet, 2024). The main citrus varieties harvested in this area include Tahitian lime, orange cv. 'Swetty,' and rangpur red lime for domestic consumption (ICA, 2019).

In the northeastern region of Valle del Cauca, one of the challenges facing local citrus marketing is that fruits are stored, transported, and distributed at ambient temperature in plastic baskets without protection measures. Some producers opt to wash the fruits using water or sodium hypochlorite solutions as conventional post-harvest treatments. According to Sun *et al.* (2012), chlorine (sodium hypochlorite), is among the most used sanitizers for fruits, typically in solutions with concentrations ranging from 50 to 200 mg/L, to help maintain the quality of fruits by reducing microbial

*Author for correspondence: Alba Mery Garzón-García
e-mail: garzon.alba@correounivalle.edu.co
Received: April 8, 2024
Accepted: May 21, 2024
Published: July 1, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2303

populations. However, chlorine has the potential to react with organic matter, forming carcinogenic by-products, and to contaminate affluents (Mishra *et al.*, 2018).

Emerging technologies such as edible coating and films, modified atmosphere packaging, application of natural preservatives and antimicrobials, high hydrostatic pressure, ozone, and ultraviolet short wave (UV-C) have been proposed for prolonging fruits quality and safety during storage, owing to their human and environmental benefits (Iturralde-García *et al.*, 2022). In the case of UV-C, its application through irradiation helps reduce microbial load and generates an elicitor effect on fruits. The effectiveness of UV-C application depends on factors such as the distance between the fruit and the lamp source (100-280 nm), fruit shape and surface characteristics, and the duration of treatment (Garzón-García *et al.*, 2020).

Pristijono *et al.* (2019) exposed Tahitian limes to UV-C irradiation and observed that this pre-storage treatment preserved the quality during storage at 10 °C for about 28 d. This preservation was achieved through a reduction in ethylene production, a decrease in the respiration rate, a delay in maturation, and an increase in overall acceptability. UV-C irradiation of minimally processed 'Satsuma' mandarins resulted in an increase in antioxidants and bioactive compound content while preserving quality attributes such as total soluble solid content, pH, titratable acidity, and ascorbic acid content (Shen *et al.*, 2013).

Based on the aforementioned information, the aim of this research was to assess the impact of UV-C treatment on the physicochemical parameters, morphology, and surface color of the primary citrus fruits cultivated in the northeastern region of Valle del Cauca, Colombia.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The fruits of rangpur red lime (*Citrus* × *limonia*), Tahitian lime *(Citrus* × *latifolia*) and sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. 'Sweety' were obtained from local farms in the municipality of Caicedonia, Valle del Cauca, Colombia. Approximately 4, 3.8, and 10 kg of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange, respectively, were taken for analysis after being collected in initial stages of maturation.

Postharvest treatments and storage conditions

The fruits of each species were divided into three lots. The first lot (control) consisted of fruits without treatment. The second lot was immersed for 5 min in a 150 mg/L sodium hypochlorite solution, drained and left to dry for 10 min (Sapers, 2014). UV-C radiation was applied to the third lot (Garzón-García *et al.*, 2023). Groups of six fruit were kept for 5 min under a 20 W UV lamp (UVC20W, ANTIVID19, Ecolite S.A.S, Cali, VAC, CO). The radiation source was located 11 cm above the work area (Figure 1). After treatments, the fruits were distributed in nine containers divided into species and treatments. These were stored under ambient conditions (26 °C with a relative humidity of 70 %) for 21 d, simulating storage at local shops.



Figure 1. Arrangement of a rangpur red lime lot for UV-C treatment.
Figura 1. Disposición de un lote de limón mandarino para el tratamiento con UV-C.

Analyses of pH, titratable acidity, and total soluble solid content

pH of samples was measured with a pH meter (HI 991001, HANNA Instruments, Woonsocket, RI, US). Titratable acidity (TA) was measured according to the AOAC 942.15 method, utilizing phenolphthalein as an indicator, and titrating with 0.1 N NaOH until a pH of 8.1 was achieved. Citric acid was considered as the primary organic acid (AOAC, 2012). Total soluble solid content (TSS) was assessed by using a digital refractometer (PAL-1, ATAGO CO., TYO, JP).

Fruit length, width, and weight

Equatorial diameter (ED or width) and polar diameter (PD or length) were determined using a caliper, following the methodology of Kadluczka and Grzebelus (2022). Fresh weight of samples was measured with a precision balance (Xtar, Lexus, UP, IN). Fruits were weighed at day 0, 7, 14, and 21 of storage. The difference between the initial and final weight was expressed as weight loss percentage (WL %) during a storage interval (Peralta-Ruiz *et al.*, 2020).

$$WL\ \% = \frac{\text{Initial weight} - \text{Weight during sampling}}{\text{Initial weight}} \quad (1)$$

Measurements of color parameters

The peel color of fruits was assessed using a 3NS800 spectrophotometer (3NH, Zengcheng District, GZ, CN), calibrated with a D65 illuminant and a 10° observer angle. Measurements were presented in CIELab coordinates (L* or lightness: white(+)/black(–), a*: red(+)/green(–), b*: yellow(+)/blue(–)) and hue (h*; 0° or 360°: red, 90°: yellow, 180°: green, and 270°: blue). Hue and yellow index (YI) were calculated according to Pathare *et al.* (2013).

$$h^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2)$$

$$YI = \frac{142.86b^*}{L^*}, \quad (3)$$

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized design with two factors and a 3×4 factorial arrangement was used for each species. The first factor was the postharvest treatment: Control (C), immersion in a sodium hypochlorite solution (SH), and UV-C exposition (UV). The second factor corresponded to the sampling time during storage (0, 7, 14, and 21 d). A two-way ANOVA and a Tukey's test were performed to assess differences in mean values between treatments and the effect of factors on pH, TA, TSS, width, length, percentage of weight loss and color parameters of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange ($p < 0.05$). The results of these tests were presented as the mean of triplicate measurements ± standard deviation in the tables, and as the mean ± standard error in the figures. The relationship between TA, TSS, width, length, and percentage of weight loss was established by means of a correlation matrix and the calculation of the Pearson correlation coefficient (ρ). All analyses were performed in Minitab 17 (Minitab Inc, State College, PA, US).

RESULTS AND DISCUSSION

pH, titratable acidity, and total soluble solid content

Figure 2 illustrates the results of the determination of pH, titratable acidity, and total soluble solid content of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange subjected to different postharvest treatments. According to the two-way ANOVA, the postharvest treatment, the storage time, and the interaction of these factors had a significant effect on physicochemical properties of rangpur red lime and Tahitian lime ($p < 0.05$). Values of pH corresponding to rangpur red lime (C: 2.45 - 2.33, SH: 2.45 - 2.25, UV: 2.45 - 2.32) and Tahitian lime (C: 2.67 - 2.42, SH: 2.67 - 2.28, UV: 2.67 - 2.41) decreased slightly during storage. However, these values were within the ranges reported for citrus fruits. Mohd-Hanif *et al.* (2016) noticed no significant changes in pH of lime (*Citrus aurantifolia*) juice irradiated with different UV dosage (from 22.76-44.24 mJ/cm^2). This last finding might be attributed to the fact that lime juice was not stored for an extended period, as opposed to the whole fruit storage duration in the current study.

TA tended to decrease until day 14 of storage, while TSS content increased throughout the storage period. Concentration of organic acids and sugars in citrus fruits depend on ripening stage, environmental conditions, and agronomical practices (Asencio *et al.*, 2018). Generally, organic acids accumulate during early stages of fruit ripening and storage, while sucrose levels are increasing (Liao *et al.*, 2019). In a separate study, sweet oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) were irradiated using ultraviolet light for six d after harvest, causing a remarkable increase in sucrose, fructose, and glucose content (Hu et *al.*, 2019). On the other hand, any factor had effect on physicochemical properties of sweet orange ($p>0.05$). Considering that pH (C: 3.47 – 3.48, SH: 3.47 – 3.59, UV: 3.47 – 3.59) and TA (C: 4.58 – 4.45, SH: 4.58 – 4.58, UV: 4.58 – 4.42) did not vary significantly, the treatments were efficient in reducing microbe during the storage time (Pan and Zu, 2012). TSS also remained almost constant during the storage period (C: 10.43 – 12.87, SH: 10.43 – 10.60, UV: 10.43 – 11.27), indicating that the orange did not undergo rapid ripening or senescence. Pristijono et *al.* (2019) irradiated Tahitian limes with different doses (0, 3.4, 7.2, and 10.5 kJ/m^2) and stored at room temperature (10 °C and a relative humidity of 80 %). Similarly, TSS and TA of Tahitian limes did not change, suggesting that pre-storage treatments did not affect these quality parameters may be due to distinct responses of defense mechanism.

Fruit length, width, and weight

The measurements of length and width confirmed that the fruits possessed an ovoid shape. This holds significance as it enables the design of processes and equipment tailored to the morphology of the fruits. It was established that postharvest treatment, storage time, and interaction between the factors had significant effects on width, length, and weight of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange ($p < 0.05$). According to Figure 3, length and width tended to decrease during the initial days of storage. Weight loss is associated with the water loss by transpiration and respiration during ripening and senescence stages (Barreto *et al.*, 2016). Moreover, when the relative humidity falls below 90 % and the ambient temperature increases, metabolic activity intensifies, leading to greater water loss and a decline in fruit quality. At the end of the storage, rangpur red limes exhibited average weight loss percentages of 30.5 %, 39.1 %, and 44.2 % for the C, SH, and UV treatments, respectively. Tahitian lime (C: 27.4 %, SH: 34.4 %, UV: 9.6 %) and sweet orange (C: 21.9 %, SH: 11.5 %, UV: 11.3 %) presented greater average weight loss percentage without treatment because of their size. Lufu *et al.* (2020) reported that larger fruits exhibit a lower rate of moisture loss compared to smaller fruits because smaller fruits have a higher surface area to volume ratio.

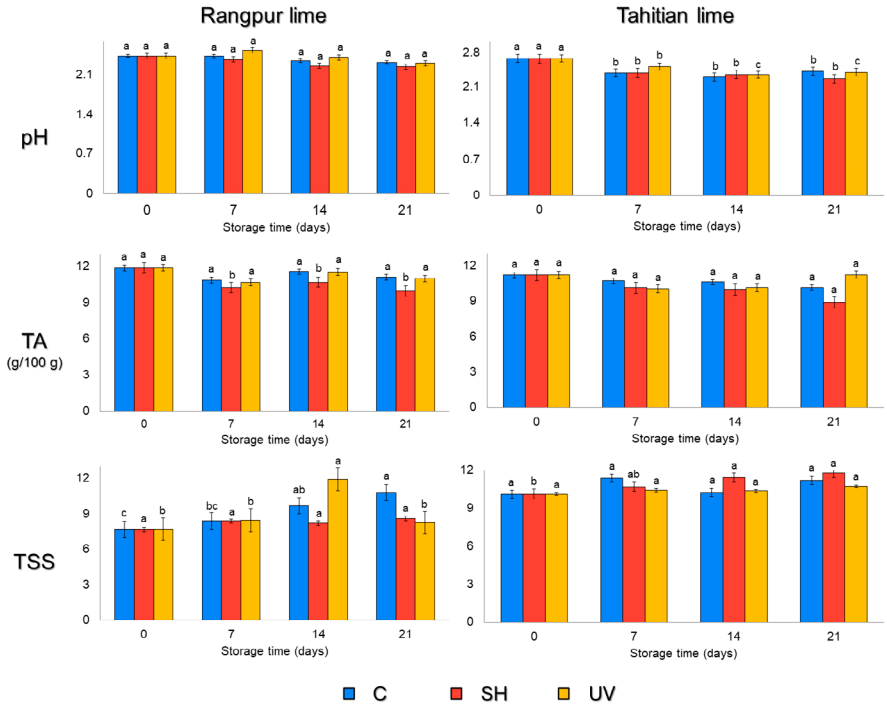


Figure 2. Values of pH, titratable acidity (TA), and total soluble solid (TSS) content of rangpur red lime and Tahitian lime, without treatment (C), treated with sodium hypochlorite (SH), and irradiated with ultraviolet short wave (UV) during storage at 26 °C for 12 d. Vertical lines correspond to standard error. Distinct lowercase letters (a-c) positioned above bars (separately for each treatment) denote significant disparities ($p < 0.05$).

Figura 2. Valores de pH, acidez titulable (TA) y contenido de sólidos solubles totales (SST) del limón mandarino y limón Tahití sin tratamiento (C), tratados con hipoclorito de sodio (SH) e irradiados con onda corta ultravioleta (UV) durante el almacenamiento a 26 °C durante 12 días. Las líneas verticales corresponden al error estándar. Las letras minúsculas distintas (a-c) dispuestas encima de las barras (por separado para cada tratamiento) denotan disparidades significativas ($p < 0.05$).

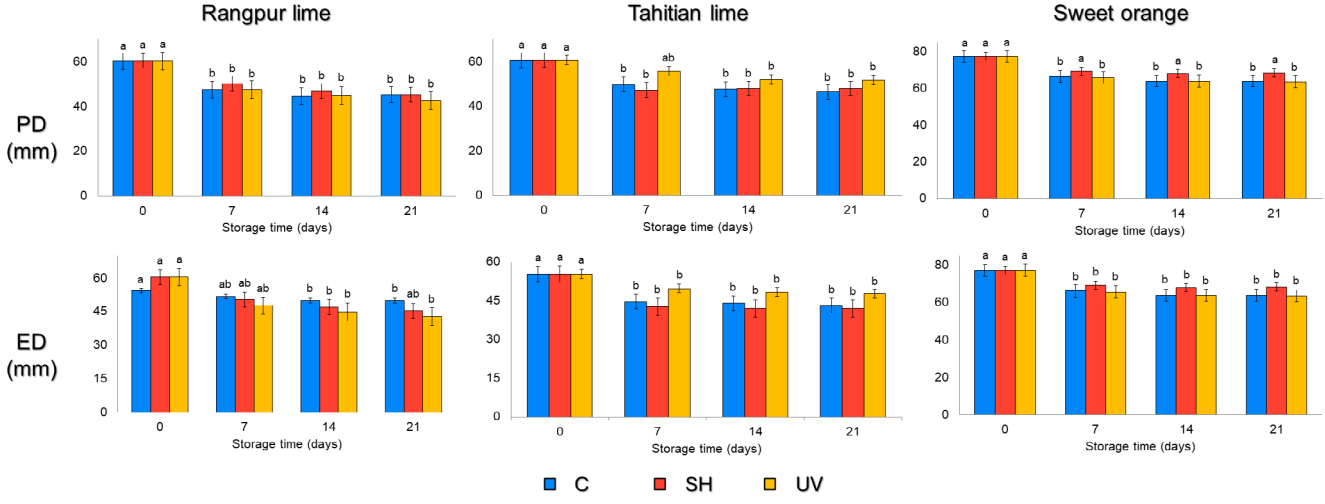


Figure 3. Values of polar diameter (PD) and equatorial diameter (EQ) of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange, without treatment (C), treated with sodium hypochlorite (SH), and irradiated with ultraviolet short wave (UV) during storage at 26 °C for 12 d. Vertical lines correspond to standard error. Distinct lowercase letters (a-b) positioned above bars (separately for each treatment) denote significant disparities ($p < 0.05$).

Figura 3. Valores del diámetro polar (PD), diámetro ecuatorial (EQ) y porcentaje de pérdida de peso (WL %) del limón mandarino, limón Tahití y de la naranja dulce sin tratamiento (C), tratados con hipoclorito de sodio (SH) e irradiados con onda corta ultravioleta (UV) durante el almacenamiento a 26 °C durante 12 d. Las líneas verticales corresponden al error estándar. Las letras minúsculas distintas (a-b) dispuestas encima de las barras (por separado para cada tratamiento) denotan disparidades significativas ($p < 0.05$).

SH and UV samples reduced weigh loss by decreasing metabolic activity and delaying respiration and transpiration rate. Pristijono *et al.* (2019) irradiated Tahitian limes with distinct doses (0, 3.4, 7.2, and 10.5 kJ/m^2) and observed that the highest dose resulted in the most significant reduction in weight loss (1.5 %) during storage for up to 28 d in air at 10 °C. Mandarin fruits cv. 'Ortanique' were subjected to disinfection by immersion in a 10 % sodium hypochlorite solution for 2 minutes. Although this treatment did not result in a significant reduction of weight loss, by the end of a 28-day storage period, the percentage of weight loss reached approximately 5 % (El Guilli *et al.*, 2016). Variations were attributed to differences in temperature and relative humidity. In the present study, higher temperatures, and a relative humidity of 70 % were considered. These conditions facilitated accelerated weight loss compared to the investigations referenced.

As Table 1 shows, there was a strong inverse correlation between weight loss and equatorial diameter. It suggested that weight loss primarily led to a decrease in the width of citrus fruits during storage. For rangpur red lime, a moderate and inverse correlation was observed between the percentage of weight loss and titratable acidity. This could be attributed to the decrease in titratable acidity being associated with a reduction in organic acid content during respiration (Burdon *et al.*, 2007). Concurrently, there is a release of CO_2 and water, contributing to weight loss. In the case of Tahitian lime, there was a moderate correlation between TA and pH, as these parameters consistently remained stable during storage. This suggests that the constancy of organic acids contributed to acidity and a low pH (Miller *et al.*, 2022). A low correlation between TA and TSS was found. As reported by Batista-Silva *et al.* (2018), during ripening of non-climacteric citrus fruits, there is a decline in titratable acidity attributed to the catabolism of citrate. Furthermore, granulation might occur as a natural process in citrus species, wherein sugar levels increase during ripening and subsequently stabilize or decrease, leading to a deterioration in the quality of citrus fruits (Johari *et al.*, 2023).

Color parameters

In accordance with the two-way ANOVA, it was found that postharvest treatment, storage time, and the interaction between these factors had a significant effect on all surface color parameters of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange ($p < 0.05$). The use of UV-C and NaClO enabled the increase of L* values for all citrus fruits throughout and at the end of the storage period, respectively (rangpur red lime: 45.610 – 59.391, Tahitian lime: 47.170 – 60.308, sweet orange: 59.643 – 61.366). Control samples exhibited accelerated ripening and granulation, leading to a dry appearance and a reduction in luminosity (rangpur red lime: 45.610 – 40.628, Tahitian lime: 47.170 – 37.281, sweet orange: 59.643 – 50.710). Conversely, SH treatment induced browning on the surfaces of the fruits (rangpur red lime: 45.610 – 51.468, Tahitian lime: 47.170 – 57.272, sweet orange: 59.643 – 54.049). Garzón-García et al. (2023) noted that immersing fresh-cut mango in a 10 mg/L sodium hypochlorite solution led to a reduction in L* values. This effect occurred because NaClO can act as an oxidizing agent. Consequently, UV-C treatment resulted in the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) activity.

According to Figure 4, the results of a* coordinate showed that the rangpur red lime reached full ripeness by day 14 of storage. Subsequently, it began to exhibit a loss of red color which may be due to carotenoids oxidation and isomerization promoted by light, temperature, oxygen, and abiotic stress during storage (Rodriguez-Amaya, 2019). Nevertheless, UV-C treatment delayed significantly changes in a* coordinate compared to the other treatments by mediating the activity of some enzymes such as carotene isomerase (Sonntag et al., 2023). On the other hand, values of a* coordinate corresponding to Tahitian lime showed slightly differences during storage, but these remained in the green scale. Pristijono et al. (2019) also found that Tahitian limes irradiated with 3.4, 7.2, and 10.5 kJ/m^2 retained the green peel color during storage. This implied that the selected UV-C treatment delayed chlorophyll degradation and the increase in phaeophytin content. However, higher UV-C doses may

Table 1. Correlation coefficient between pH, titratable acidity (TA), total soluble solid (TSS), polar diameter (PD), equatorial diameter (EQ), and weight loss percentage (WL %) of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange.
Tabla 1. Coeficiente de correlación entre pH, acidez titulable (TA), sólidos solubles totales (SST), diámetro polar (PD), diámetro ecuatorial (EQ) y porcentaje de pérdida de peso (WL %) del limón mandarino, limón Tahití y naranja dulce.

Correlation	Citrus fruit					
	Rangpur red lime		Tahitian lime		Sweet Orange	
	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value	Coefficient	p-value
TA-pH	0.317	0.060	0.538	0.001	0.308	0.067
TA-TSS	-0.012	0.950	-0.358	0.032	-0.091	0.597
WL %-TA	-0.465	0.004	-0.547	0.001	0.110	0.522
WL %-ED	-0.901	0.000	-0.928	0.000	-0.792	0.000
WL %-PD	-0.879	0.000	-0.801	0.000	-0.649	0.000

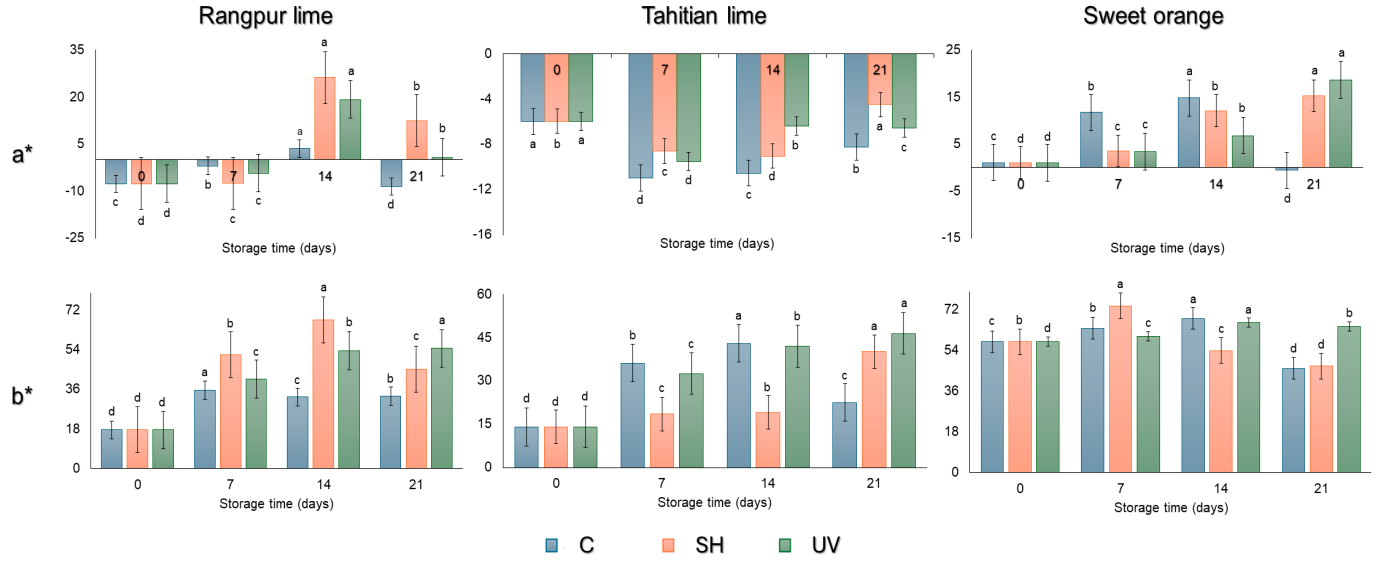


Figure 4. Values of a* and b* of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange, without treatment (C), treated with sodium hypochlorite (SH), and irradiated with ultraviolet short wave (UV) during storage at 26 °C for 12 d. Vertical lines correspond to standard error. Distinct lowercase letters (a-b) positioned above bars (separately for each treatment) denote significant disparities ($p < 0.05$).

Figura 4. Valores de las coordenadas a* y b* del limón mandarino, limón Tahití y de la naranja dulce sin tratamiento (C), tratados con hipoclorito de sodio (SH) e irradiados con onda corta ultravioleta (UV) durante el almacenamiento a 26 °C durante 12 d. Las líneas verticales corresponden al error estándar. Las letras minúsculas distintas (a-b) dispuestas encima de las barras (por separado para cada tratamiento) denotan disparidades significativas ($p < 0.05$)

lead to nonenzymatic browning and a reduction in brightness and green color (Sonntag et al., 2023). For sweet orange, sodium hypochlorite and UV-C treatments were found to regulate ripeness and inhibited browning. Untreated samples exhibited a decrease in a* values after day 14 of storage, possibly for the increment of metabolism activity and thus, the enzymes activity responsible for carotenoid degradation.

The b* coordinate also indicated the apparition of red tones and the accumulation carotenoids in citrus fruits (Lado et al., 2019), as shown in Figure 4. For rangpur red lime, untreated fruits and samples treated with NaClO showed a rapid increase in b* values until day 14 of storage. Afterward, these values tended to stabilize and decrease, respectively. Conversely, the UV-C treatment demonstrated an elicitor effect, as the values of a* increased in irradiated samples during storage. As reported by Castillejo et al. (2022), UVR8 protein is a UV-B and UV-C specific photoreceptor that interacts with COP1 and regulates HY5 gene expression, which increases the production of carotenoids for photoprotection. For Tahitian lime, the b* values of untreated samples declined after day 14 of storage, possibly due to granulation and the fruit taking on grayish hues (Sharma et al., 2006). In contrast, samples treated with sodium hypochlorite and UV-C exhibited a tendency to increase the a* coordinate until the end of the storage period. Sweet oranges showed an increase in the a* coordinate until day 14 of storage, which indicate fruit maturation. Following that, a* values for untreated samples and those treated with NaClO showed a tendency to decrease. UV-C treatment could preserve the yellow by reducing ethylene production (Lacerna et al., 2018).

In Table 2, the values of h* and YI of samples are presented with the results of two-way ANOVA and Tukey post-hoc test. The calculation of YI and h* allowed to establish that untreated samples experienced accelerated ripening at the start of storage, and granulation towards the end of the storage period, respectively. The treatments effectively prevented accelerated ripening. Nevertheless, UV-C irradiation induced uniform coloration on the citrus fruits peel, as evidenced by the rise in YI. According to Pristijono et al. (2019), the green color is a crucial factor for marketing Tahitian limes. Typically, lower hue values are exhibited during storage, accompanied by the emergence of yellow tones due to maturation.

CONCLUSIONS

This research highlights the importance of postharvest treatment in citrus fruits before their distribution and market locally. In general, the lack of a postharvest treatment significantly promotes weight loss and accelerated ripening. The decrease in dimensions of citrus fruits, especially in terms of width, and the occurrence of granulation, contribute to a loss of quality and acceptance. It was found that the application of UV-C allowed to preserve the shelf-life of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange cv. 'Sweety' for 21 d at 26 °C and a relative humidity of 70 %, based on psychochemical, morphological, and color parameters. Further studies should focus on sensory, microbiological, and bioactive compound analyses.

Table 2. Hue (h*) and yellow index (YI) of rangpur red lime, Tahitian lime, and sweet orange, without treatment (C), treated with sodium hypochlorite (SH), and irradiated with ultraviolet short wave (UV) during storage at 26 °C for 12 d. Values corresponded to mean ± standard deviation. For each color parameter, means that do not share the same letter are significantly different ($p < 0.05$).
Tabla 2. Tono (h*) e índice de amarillamiento (YI) del limón mandarino, limón Tahití y de la naranja dulce sin tratamiento (C), tratados con hipoclorito de sodio (SH) e irradiados con onda corta ultravioleta (UV) durante el almacenamiento a 26 ° C durante 12 d. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar. Para cada parámetro de color, las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Color parameter	Treatment	Storage time (d)			
		0	7	14	21
Rangpur red lime					
	C	113.367±0.081^{a}	93.048±0.026^{e}	83.764±0.005^{g}	104.408±0.003^{b}
h*	SH	113.367±0.081^{a}	98.224±0.000^{c}	68.808±0.002^{j}	74.547±0.008^{h}
	UV	113.367±0.081^{a}	95.940±0.008^{d}	70.256±0.023^{i}	89.141±0.003^{f}
	C	55.347±0.521^{i}	89.705±0.365^{h}	99.149±0.008^{g}	115.846±0.316^{f}
YI	SH	55.347±0.521^{i}	124.757±0.044^{d}	147.438±0.034^{a}	125.649±0.024^{d}
	UV	55.347±0.521^{i}	118.809±0.212^{e}	136.352±0.207^{b}	131.475±0.061^{c}
Tahitian lime					
	C	112.983±0.071^{c}	106.865±0.003^{e}	103.754±0.010^{g}	110.122±0.005^{d}
h*	SH	112.983±0.071^{c}	114.938±0.061^{b}	115.301±0.015^{a}	96.396±0.003^{j}
	UV	112.983±0.071^{c}	106.315±0.021^{f}	98.643±0.003^{h}	98.025±0.007^{i}
	C	42.583±0.557^{i}	112.721±0.227^{b}	119.760±0.132^{a}	86.368±0.076^{f}
YI	SH	42.583±0.557^{i}	82.521±0.507^{g}	76.047±0.127^{h}	111.874±0.126^{b}
	UV	42.583±0.557^{i}	93.932±0.048^{e}	105.209±0.039^{d}	110.107±0.060^{c}
Sweet orange					
	C	88.923±0.021^{b}	79.5853±0.037^{f}	77.763±0.014^{g}	90.710±0.011^{a}
h*	SH	88.923±0.021^{b}	87.242±0.004^{c}	77.327±0.003^{h}	72.057±0.005^{j}
	UV	88.923±0.021^{b}	86.714±0.010^{d}	84.132±0.006^{e}	73.885±0.002^{i}
	C	138.564±0.037^{e}	147.920±0.824^{c}	157.004±0.276^{a}	129.798±0.054^{g}
YI	SH	138.564±0.037^{e}	150.205±0.149^{b}	131.721±0.109^{f}	124.561±0.044^{h}
	UV	138.564±0.037^{e}	139.977±0.039^{d}	156.934±0.239^{a}	150.420±0.016^{b}

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg.

Asencio, A.D., Serrano, M., García-Martínez, S. and Pretel, M.T. 2018. Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. European Food Research and Technology. 244: 1497-1508.

Barreto, T.A., Andrade, S.C.A, Maciel, J.F., Arcanjo, N.M.O., Madruga, M.S., Meireles, B., Cordeiro, Â.M.T., Souza, E.L. and Magnani, M. 2016. A chitosan coating containing essential oil from *Origanum vulgare* L. to control postharvest mold infections and keep the quality of cherry tomato fruit. Frontiers in Microbiology. 7:1724.

Batista-Silva, W., Nascimento, V.L., Medeiros, D.B., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, D.M., Zsögön, A. and Araújo, W.L. 2018. Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? Frontiers in Plant Science. 9: 1689.

Burdon, J., Lallu, N., Yearsley, C., Osman, S., Billing, D. and Boldingh, H. 2007. Postharvest conditioning of Satsuma mandarins for reduction of acidity and skin puffiness. Postharvest Biology and Technology. 43: 102-114, 1.

Castillejo, N., Martínez-Zamora, L. and Artés-Hernández, F. 2022. Postharvest UV radiation enhanced biosynthesis of flavonoids and carotenes in bell peppers. Postharvest Biology and Technology. 184: 111774.

El Guilli, M., Hamza, A., Clément, C., Ibriz, M. and Ait Barka, E. 2016. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan to control citrus green mold. Agriculture. 6: 12, 2.

Estadísticas Agropecuarias. [Retrieved 3 April 2024] 2024. Available in: https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx

Garzón-García, A.M., Ruiz-Cruz, S., Dussán-Sarria, S., Hleap-Zapata, J.I., Márquez-Ríos, E., Del-Toro-Sánchez, C., Tapia-Hernández, J.A., Canizales-Rodríguez, D.F. and Ocaño-Higuera, V.M. 2023. Effect of UV-C postharvest disinfection on the quality of fresh-cut 'Tommy Atkins' mango. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 73: 39-49, 1.

Garzón-García, A.M., Ruiz-Cruz, S., Márquez-Ríos, E., Dussán-Sarria, S., Hleap-Zapata, J.I. and Lobatón, H.F. 2020. Computational fluid dynamics as a technique for the UV-C light dose determination in horticultural products. Biotecnia. 22: 84-92, 1.

Hu, L., Yang, C., Zhang, L., Feng, J. and Xi, W. 2019. Effect of Light-Emitting Diodes and Ultraviolet Irradiation on the Soluble Sugar, Organic Acid, and Carotenoid Content of Postharvest Sweet Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Molecules. 24: 3440, 19.

Iturralde-García, R. D., Cinco-Moroyoqui, F. J., Martínez-Cruz, O., Ruiz-Cruz, S., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Cornejo-Ramírez, Y.I., Bernal-Mercado and A.T. Del-Toro-Sánchez, C. L.

2022. Emerging technologies for prolonging fresh-cut fruits' quality and safety during storage. Horticulturae. 8: 731, 8.

Johari, N.H.F., Dolhaji, N.H., Shamsuri, S. and Latif, P.A. 2023. A Review on Sugar and Organic Profiles on the Postharvest Quality of Fruits. Science Letters. 17: 91-108, 2.

Kadluczka, D. and Grzebelus, E. 2022. Comparative fruit morphology and anatomy of wild relatives of carrot (*Daucus*, Apiaceae). Agriculture. 12: 2104, 12.

Lacerna, M.M. and Bayogan, E.V. 2018. Rind color change and granulation in pummelo [*Citrus maxima* (Burm. ex Rumph.) Merr.] fruit as influenced by 1-methylcyclopropene. International Food Research Journal. 25: 1483-1488, 4.

Lado, J., Alós, E., Manzi, M., Cronje, P.J., Gómez-Cadenas, A., Rodrigo, M. J. and Zacarías, L. 2019. Light regulation of carotenoid biosynthesis in the peel of mandarin and sweet orange fruits. Frontiers in Plant Science. 10: 1288.

Liao, L., Dong, T., Qiu, X., Rong, Y., Wang, Z. and Zhu, J. 2019. Nitrogen nutrition is a key modulator of the sugar and organic acid content in citrus fruit. PLoS ONE. 14: e0223356, 10.

Lufu, R., Ambaw, A. and Opara, U. L. 2020. Water loss of fresh fruit: Influencing pre-harvest, harvest and postharvest factors. Scientia Horticulturae. 272: 109519.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Cheng, L. and Liu, Y. 2015. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. Chemistry Central Journal. 9: 1-14.

Miller, B.A., Kostick, S.A., and Luby, J.J. 2022. Large-effect QTLs for titratable acidity and soluble solids content validated in 'Honeycrisp'-derived apple germplasm. Agronomy. 12: 1703, 7.

Mishra, V., Abrol, G.S. and Dubey, N. 2018. Sodium and calcium hypochlorite as postharvest disinfectants for fruits and vegetables. In Postharvest disinfection of fruits and vegetables. M.W. Siddiqui (ed.), pp. 253-272. Academic Press, Sabour.

Mohd-Hanif, H., Shamsudin, R. and Adzahan, N.M. (2016). UVC dosage effects on the physico-chemical properties of lime (*Citrus aurantifolia*) juice. Food Science and Biotechnology. 25: 63-67.

Pan, Y. and Zu, H. 2012. Effect of UV-C radiation on the quality of fresh-cut pineapples. Procedia Engineering. 37: 113-119.

Pathare, P.B., Opara, U.L. and Al-Said, F.AJ. 2013. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. Food Bioprocess Technology. 6: 36-60.

Peralta-Ruiz, Y., Grande Tovar C.D., Sinning-Mangonez, A., Coronell, E.A., Marino, M.F. and Chavez-Lopez, C. Polymers. 12: 1822, 8.

Pereira Gonzatto, M. and Scherer Santos, J. 2023. Introductory Chapter: World Citrus Production and Research. In Citrus Research-Horticultural and Human Health Aspects. M. Pereira Gonzatto and J. Scherer Santos, pp. 97. IntechOpen.

Pristijono, P., Bowyer, M.C., Papoutsis, K., Scarlett, C.J., Vuong, Q.V., Stathopoulos, C.E. and Golding, J.B. 2019. Improving the storage quality of Tahitian limes (*Citrus latifolia*) by pre-storage UV-C irradiation. Journal of Food Science and Technology. 56: 1438-1444.

Productores de viveros de cítricos en el Valle del Cauca se capacitan en normatividad del ICA para registrar sus predios. [Retrieved 3 April 2024] 2019. Available in: https://www.ica.gov.co/noticias/productores-de-viveros-de-citricos-en-el-valle-del

Rodriguez-Amaya, D.B. 2019. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. Food Research International. 124: 200-205.

Sapers, G.M. 2014. Disinfection of contaminated produce with conventional washing and sanitizing technology. In The Produce Contamination Problem: Cases and Solutions. K.R. Matthews, G.M. Sapers and C. P. Gerba (ed.), pp. 389-431. Academic Press, San Diego.

Sharma, R.R., Singh, R. and Saxena, S.K. 2006. Characteristics of citrus fruits in relation to granulation. Scientia Horticulturae. 111: 91-96, 1.

Shen, Y., Sun, Y., Qiao, L., Chen, J., Liu, D. and Ye, X. 2013. Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed Satsuma mandarin during refrigerated storage. Postharvest Biology and Technology. 76: 50-57.

Sonntag, F., Liu, H. and Neugart, S. 2023. Nutritional and physiological effects of postharvest UV radiation on vegetables: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 71: 9951-9972, 26.

Sun, S.H., Kim, S.J., Kwak, S.J. and Yoon, K.S. 2012. Efficacy of sodium hypochlorite and acidified sodium chlorite in preventing browning and microbial growth on fresh-cut produce. Preventive Nutrition and Food Science. 17: 210-216, 3.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo original

Actividad de un bioestimulante en la tasa fotosintética y contenido de clorofila de *Ocimum basilicum* L. sometida a estrés por NaCl

Activity of a biostimulant on the photosynthetic rate and chlorophyll content of *Ocimum basilicum* L. subjected to NaCl stress

Daulemys Batista-Sánchez[1], Bernardo Murillo-Amador[1]*, Carlos Michel Ojeda-Silvera[2], Alejandra Nieto-Garibay[1], José Manuel Mazón-Suástegui[1], Betzabe Ebenhezer López Corona[3]

[1] Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, México. C.P. 23096.
[2] CONAHCYT, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
[3] Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, México.

RESUMEN

Las sustancias promotoras de crecimiento mejoran mecanismos fisiológicos en las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del FitoMas-E® en el contenido de clorofilas y la tasa fotosintética de plantas de albahaca cultivadas en un sistema hidropónico en condiciones salinas. Para esto se estudiaron tres variedades de albahaca (Napoletano, Nufar y Emily) las variables evaluadas fueron la clorofila a, clorofila total, a los 20, 40 y 60 días posteriores al trasplante (DPT) y la tasa fotosintética (TF) a los 14, 21, 45 y 60 DPT. El estudio se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 24 tratamientos y cuatro repeticiones. Donde el factor A fueron las variedades, el factor B las concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM) y el factor C, las dosis de FitoMas-E® (0 y 0.5 mL L^{-1}). Las variables evaluadas disminuyeron al incrementar la concentración de NaCl en las tres variedades, mientras que la aplicación foliar del bioestimulante aumentó la TF, cuando el contenido de NaCl fue severo (100 y 150 mM). Una respuesta similar a la TF se encontró para el contenido de pigmentos. Los resultados confirman que el FitoMas-E® es un producto que estimula la concentración de clorofilas, e incremento de la tasa fotosintética, lo que coadyuva a mitigar los efectos nocivos de la salinidad (NaCl) en albahaca.

Palabras clave: albahaca, estrés abiótico, FitoMas-E®, fotosíntesis, pigmento.

ABSTRACT

Growth-promoting substances improve physiological mechanisms in plants. The objective of this study was to evaluate the effect of FitoMas-E® on the chlorophyll content and photosynthetic rate of basil plants grown in a hydroponic system under saline conditions. For this, three varieties of basil were studied (Napoletano, Nufar and Emily), the variables evaluated were chlorophyll a and total chlorophyll at 20, 40 and 60 days after transplantation (DPT), and the photosynthetic rate (TF) at 14, 21,45 and 60 DPT. The study was carried out under a completely randomized experimental design with a factorial arrangement of 24 treatments and four repetitions, where factor A were the varieties, factor B the NaCl concentrations (0, 50, 100 and 150 mM) and factor C, the FitoMas-E® doses (0 and 0.5 mL L^{-1}). The evaluated variables decreased with increasing NaCl concentration in the three varieties, while the foliar application of the biostimulant increased the TF, when the NaCl content was severe (100 and 150 mM). A similar response to TF was found for pigment content. The results confirm that FitoMas-E® is a product that stimulates the concentration of chlorophylls and increases the photosynthetic rate, which helps mitigate the harmful effects of salinity (NaCl) in basil.

Keywords: abiotic stress, basil, FitoMas-E®, photosynthesis, pigment.

INTRODUCCIÓN

La irrigación inadecuada de los suelos, así como el cambio climático provocan que, la salinidad alcance un nivel alto con amplio efecto perjudicial a nivel mundial (Cristo-Valdés *et al*., 2018). Dentro de los principales daños que causa en las plantas se encuentra efecto osmótico que induce un déficit hídrico por exceso de sales en el suelo, provocando la pérdida de turgencia al disminuir la absorción de agua. Otro es la toxicidad iónica que está asociado a la absorción excesiva de iones Na^+ y Cl^- principalmente; con el aumento de estos iones ocurre una disminución en la captación y absorción de iones esenciales (K, P, Ca, Mn) y esto conlleva a un desbalance nutricional en las plantas. Producto a estas combinaciones ocurre el estrés oxidativo, relacionado con el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Postnikova y Nemchinov, 2015; Pan *et al*., 2021). El estrés por salinidad limita la absorción del sistema radical, disminuye la actividad estomática, induce un desbalance del metabolismo en las plantas, disminuye la transpiración, la tasa fotosintética; esto repercute de forma negativa en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Zörb *et al*., 2019). Una disminución de la fotosíntesis en presencia de estrés por sales puede ser el resultado de la pérdida de turgencia, la retroinhibición de la enzima rubisco del ciclo de Calvin al originar un efecto alostérico imposibilitando que la enzima no pueda unirse a su sustrato,

*Autor para correspondencia: Bernardo Murillo-Amador
Correo-e: bmurillo04@cibnor.mx
Recibido: 3 de abril de 2024
Aceptado: 11 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2301

por otro lado la deficiencia de nutrientes provocada por la toxicidad causada por el ingreso excesivo de Na^+ y Cl^- al flujo de transpiración, que posteriormente dañan las células de las hojas, comprometiendo la tasa fotosintética y la disminución de la actividad de los pigmentos fotosintéticos (Achón-Forno *et al*., 2014; Sánchez *et al*., 2018). Existen diferentes métodos para conseguir producciones en condiciones adversas para los cultivos, entre los más comunes se encuentran el mejoramiento genético, métodos fitotécnicos, uso de fitohormonas y en los últimos años una alternativa eficaz y destacada es el uso de productos de origen natural como los bioestimulantes, este último es uno de los métodos más eficientes para incrementar el rendimiento de las especies agrícolas aun en condiciones desfavorables (Reyes *et al*., 2017), por la presencia de sustancias biológicamente activas y rápida absorción, facilita la activación de mecanismos de defensa en las plantas que le permiten realizar su metabolismo de forma eficiente aún en presencia de altas concentraciones salinas (Batista-Sánchez *et al*., 2022). Estos compuestos son catalizadores de procesos vitales para las plantas, pues su uso logra mayor eficiencia en la utilización de los nutrimentos, beneficiando el incremento y volumen celular, cambios fenológicos positivos como el aumento de la biomasa y estimulación de mecanismos de tolerancia ante situaciones adversas (Batista-Sánchez *et al*., 2019; Calero-Hurtado *et al*., 2022). La diversidad de bioestimulantes de diferente naturaleza que en la actualidad se utilizan en la agricultura, incluye al FitoMas-E®, producto de origen natural, derivado de la industria azucarera cubana, está avalado por su actividad antiestrés, este bioestimulante es una combinación de materia orgánica, aminoácidos totales (alifáticos, aromáticos y heterocíclicos), sacáridos, polisacáridos, lípidos y bases nitrogenadas, todos con actividad biológica activa (Pulido-Vega *et al*., 2013). Estos compuestos forman parte del metabolismo vegetal, al encontrarse biodisponibles para las plantas se disminuye el gasto energético extra para sintetizarlas lo que favorece una respuesta positiva ante factores estresantes (Calero-Hurtado *et al*., 2019). La mezcla contenida en el FitoMas-E® vigoriza diversos cultivos, en todas las etapas del crecimiento y desarrollo; también estimulan respuestas positivas en las plantas ante situaciones de exceso de humedad, sequía, plagas, fitotoxicidad y recientemente se ha comprobado su efectividad como mitigador de los efectos negativos del estrés salino (Castillo-Portela *et al*., 2011, Pulido-Vega *et al*., 2013; Batista-Sánchez *et al*., 2022).

La albahaca se cultiva en suelos de fertilidad media, con buen drenaje y una conductividad eléctrica de hasta 4 dS m^{-1} sin que se afecten los rendimientos ni su desarrollo; por encima de 4 dS m^{-1} se afecta con pérdidas superiores al 60% (Barroso, 2004). Esta aromática es una de las especies más cultivadas en Baja California Sur (BCS), con potencial alto para el mercado de exportación (Ojeda-Silvera *et al*., 2015; Mazón-Suástegui *et al*., 2022), porque sus aceites esenciales, se utilizan en la producción de fragancias, cosméticos, para aromatizar vinagres, como condimento fresco y son conocidas también sus propiedades diuréticas y estimulantes (Sánchez *et al*., 2000). Esta especie es una fuente importante de ingresos económicos para productores de cultivos orgánicos en el estado, sin embargo, la productividad del cultivo de albahaca está en riesgo porque las áreas agrícolas con tendencia a la salinidad han aumentado debido al clima semiárido de BCS (Mazón-Suástegui *et al*., 2022). La salinidad puede mitigarse mediante alternativas de solución que permitan incrementar la productividad de las especies cultivadas en estas condiciones, no sólo utilizando variedades tolerantes sino aplicando métodos que minimicen los daños del estrés por salinidad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del FitoMas-E® en el contenido de clorofilas y la tasa fotosintética de variedades de albahaca con respuesta diferencial al estrés por salinidad (NaCl) y cultivadas en un sistema hidropónico. Los sistemas hidropónicos son considerados una vía de obtener productos agrícolas orgánicos, de gran ventaja para la investigación por la accesibilidad a todos los tejidos de la planta y la manipulación fácil del perfil de nutrientes en la solución de crecimiento. Otra ventaja destacable es que acaba con uno de los grandes problemas en los cultivos tradicionales el cual es la erosión del suelo por monocultivo y la acumulación de sales en el suelo. Si se combina con el uso de invernaderos a fin de controlar factores como la temperatura, reducir la pérdida de agua por evaporación, radiación, viento, lluvia controlar la presencia de plagas, enfermedades y contacto con animales (Lee *et al*., 2018; Albuja *et al*., 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en una casa de malla sombra (1610 PME-CR con 40 % de sombra), en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, localizado al norte de la Ciudad de La Paz, Baja California Sur, a los 24° 08'10.03" LN y 110° 25'35.31" LO, a 7 metros de altura sobre el nivel del mar. El promedio de las temperaturas media, máxima y mínima en del sitio experimental fueron, 26.84±5.21, 44.17±4.92, 13.40±5.83 °C, respectivamente, con una humedad relativa de 52.8±14.95 %. Las condiciones temporales del clima en el área experimental se registraron con una estación climatológica portátil (Vantage Pro2®, Davis, CA, USA).

Material vegetal

Se utilizaron semillas certificadas provenientes de Seed Vis® Company (Arcadia, CA, USA) de tres variedades de albahaca Nufar, Emily y Napoletano con respuesta diferencial al estrés por NaCl de acuerdo con Batista-Sánchez *et al*., 2015; Batista-Sánchez *et al*., 2017**.**

Dosis de biostimulante y niveles de salinidad

Se emplearon dosis de 0 y 0.5 mL L^{-1} del bioestimulante FitoMas-E®, procedente de la industria azucarera de Cuba. El FitoMas-E® es un coctel natural de sales inorgánicas y otras sustancias de elevada energía, en la que se encuentran aminoácidos, polisacáridos biológicamente activos, lípidos, bases nitrogenadas, materia orgánica y nutrientes (Montano *et al*., 2007). Los niveles de salinidad en estudio fueron 0, 50, 100 y 150 mM de NaCl.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial (3A × 4B ×2C) para un total de 24 tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento, considerando como factor A, las variedades de albahaca con tres niveles (Nufar, Emily y Napoletano) el factor B, las concentraciones de NaCl con cuatro niveles (0, 50, 100 y 150 mM) y el factor C, las dosis de FitoMas-E® con dos niveles (0 y 0.5 mL L^{-1}).

Manejo experimental

Las semillas de las tres variedades de albahaca se sembraron en charolas de poliestireno utilizando un sustrato comercial inerte (Sogemix VT-M®, Premier Horticulture Inc., Canadá). Se logró la homogeneidad en la emergencia de las plántulas mediante riegos a saturación del sustrato cada 24 h, para lograr mantener la humedad de este. Cuando las plántulas tenían una altura promedio de 10 cm se realizó el trasplante, en canastillas hidropónicas de 150 mL que contenían un sustrato a base de vermiculita (Hortiperl, Termolita® S.A de C.V, México) y un fragmento de fibra absorbente (Magitel®, México) para garantizar la interacción del sistema radical con el medio de cultivo. Las canastillas con las plántulas (seis por cada contenedor) se colocaron en un sistema hidropónico de raíz flotante, el cual consistió en utilizar contenedores de poliuretano expandido de 69 × 38.5 × 25 cm, aforados a una capacidad 38 L con agua de 0.22 $dS.m^{-1}$ de conductividad eléctrica.

La solución nutritiva (SN) se utilizó de acuerdo con Samperio (1997) y se ajustó para albahaca a razón de 1 L de SN por cada 100 L de H_2O y estuvo compuesta por nitrato de potasio 160 g L^{-1}, nitrato de amonio 30.6 g L^{-1}, fosfato mono amónico 44.4 g L^{-1}, nitrato de calcio 180.6 g L^{-1}, sulfato de magnesio 126 g L^{-1}, sulfato ferroso 6 g L^{-1}, sulfato de manganeso 1.5 g L^{-1}, sulfato de zinc 0.3 g L^{-1}, sulfato de cobre 0.3 g L^{-1}, ácido bórico 0.3 g L^{-1}. Se le determinó el pH para comprobar que estuviera en nivel adecuado (6.5±0.4). Los tratamientos con FitoMas-E® se aplicaron luego de un tiempo de adaptación de una semana posterior al trasplante, mediante la aspersión foliar a las plantas en el horario 8:00-9:00 am (cada siete días hasta finalizar el experimento a los 65 días), con dosis de 0.5 mL L^{-1} y agua destilada como tratamiento control. Después del periodo de aclimatación de las plántulas, se aplicaron los tratamientos salinos (NaCl) en el medio de cultivo de forma progresiva, para evitar un shock osmótico (Murillo-Amador *et al*., 2007), empezando con 25 mM de NaCl hasta llegar a la concentración deseada (50, 100 y 150 mM). Para garantizar mantener las concentraciones salinas deseadas durante el periodo experimental, se realizaron mediciones directas al medio de cultivo con ayuda de medidores multiparámetros (Orion Star A322, LAQUAtwin), en los casos necesarios se realizaron las debidas correcciones**.**

Cuantificación de clorofilas

El contenido de clorofila a (Chl a) y total (Chl total) se determinó a los 20, 40 y 60 días posterior al trasplante (DPT) utilizando una planta por repetición. Usado la tercera hoja a partir del punto de crecimiento se lavaron con agua desionizada para eliminar impurezas. La toma de muestra para la extracción de clorofila se realizó en hojas completamente expandidas, empleando 1g de tejido vegetal fresco, que posteriormente se trituró en acetona al 90 %. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro con UV/Visible spectrophotometer (Pye Unicam SP6-550 UK) y las concentraciones de Chl se calcularon usando la ecuación de Strain y Svec (1966):

$$\text{Chl a } (mg.mL^{-1}) = 11.64 \times (A663) - 2.16 \times (A645) \quad (1)$$

$$\text{Chl b } (mg.mL^{-1}) = 20.97 \times (A645) - 3.94 \times (A663) \quad (2)$$

(A663) y (A645) representan los valores de la absorbancia leídos a 663 y 645 nm de longitud de onda, respectivamente.

Tasa fotosintética

La tasa fotosintética (TF) se determinó utilizando el medidor de fotosíntesis Li-Cor, modelo 6400XT (Li-cor®, Lincoln, Nebraska, USA), en hojas totalmente expandidas, durante el horario de mayor intensidad luminosa (12:00 h). La TF se determinó a los 14, 21, 45 y 60 DPT.

Análisis estadísticos

Las variables independientes se sometieron al análisis de varianza y se consideraron diferentes significativamente cuando $p \leq 0.05$. Las diferencias encontradas en los promedios de las variables independientes en cada factor de estudio, se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey HSD, a una $p = 0.05$. El programa para realizar los análisis estadísticos fue Statistica® v. 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc. 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de clorofilas

El estudio interactivo variedades × NaCl × FitoMas-E® (20 DPT), mostró diferencias significativas solo para Chl a y Chl total. También se encontró diferencia del contenido de clorofilas (Chl a y Chl total) entre las variedades, alcanzando mayores valores Napoletano>Nufar>Emily en 0 mM NaCl, con aplicación de FitoMas-E®. Conforme las concentraciones de NaCl incrementaron, los pigmentos evaluados disminuyeron significativamente, mostrando los valores inferiores en el tratamiento de 150 mM NaCl sin el bioestimulante en todas las variedades. Este resultado puede ser generado por el estrés salino inducido, lo que provoca la destrucción de los cloroplastos por un aumento en la actividad de la enzima clorofilasa, lo que afecta la síntesis de clorofila (Ji *et al*., 2018). Se observó que las plantas que recibieron 150 mM NaCl con aplicación de FitoMas-E® incrementaron los valores de Chl a y Chl total con respecto a las plantas que fueron tratadas con 150 mM NaCl sin aplicar el bioestimulante (Tabla 1). Estos hallazgos se pueden explicar por la presencia de aminoácidos contenidos en el bioestimulante como es el ácido glutámico (Glu), que en conjunto con glicina (Gly), arginina (Arg) y alanina (Ala) intervienen en la síntesis de clorofila, en la actividad fotosintética y aumentan la cantidad de clorofila

Tabla 1. Efecto de la interacción variedades × NaCl × FitoMas-E® en el contenido de clorofilas de plantas de albahaca sometidas a estrés por NaCl
Table 1. Effect of the varieties × NaCl × FitoMas-E® interaction on chlorophylls content of basil plants subjected to NaCl stress.

Variedades	NaCl (mM)	FitoMas-E® (mL.L^{-1})	Clorofila					
			20 DPT		40 DPT		60 DPT	
			Clorofila a (µg.cm^{-2})	Clorofila total (µg.cm^{-2})	Clorofila a (µg.cm^{-2})	Clorofila total (µg.cm^{-2})	Clorofila a (µg.cm^{-2})	Clorofila total (µg.cm^{-2})
Napoletano	0	0	30.36 abcd*	39.24 abc	30.55 ab	39.80 ab	23.88 abc	30.64 abc
		0.5	32.38 a	41.91 a	32.38 a	43.24 a	26.29 a	34.44 a
	50	0	27.07 ghij	34.51 efghijk	27.06 cdefgh	35.70 defgh	21.96 bcdef	28.49 bcde
		0.5	29.60 bcde	38.31 bcd	30.54 ab	39.42 bc	24.46 ab	32.07 ab
	100	0	27.21 fghij	36.04 cdefghi	27.21 cdefg	35.68 defgh	22.33 bcdef	29.00 bcde
		0.5	28.35 cdefgh	36.06 cdefgh	28.35 bcdef	36.04 cdefg	22.50 bcdef	29.06 bcde
	150	0	24.03 lm	30.66 lm	23.03 i	29.66 k	20.28 efg	26.36 defg
		0.5	25.96 ijkl	33.44 ghijkl	26.47 defgh	34.13 efghij	20.31 efg	26.62 cdefg
Nufar	0	0	29.86 bcd	39.44 abc	29.86 abc	39.00 bcd	22.61 bcdef	29.50 bcde
		0.5	31.82 ab	40.30 ab	30.49 ab	39.44 bc	24.56 ab	31.87 ab
	50	0	27.39 efghij	35.30 defghi	27.06 cdefgh	34.88 efghi	19.50 fgh	25.38 efgh
		0.5	28.96 cdefg	36.86 bcdefg	28.71 bcde	37.44 bcde	22.45 bcdef	29.13 bcde
	100	0	25.38 jkl	32.59 ijkml	25.38 fghi	32.59 ghijk	18.50 gh	24.29 fgh
		0.5	26.04 hijkl	33.82 fghijkl	26.63 defgh	34.69 efghij	21.82 bcdef	28.15 bcdef
	150	0	22.76 m	29.20 m	22.76 i	29.20 k	17.00 hi	22.63 ghi
		0.5	24.50 klm	31.76 jklm	24.37 ghi	32.19 hijk	18.45 gh	24.33 fgh
Emily	0	0	29.52 bcdef	37.81 bcde	29.45 abcd	37.61 bcde	22.95 bcde	29.51 bcd
		0.5	30.62 abc	39.56 ab	30.88 ab	39.40 bc	23.74 abcd	30.52 abc
	50	0	26.78 ghijk	35.08 defghij	25.93 efghi	33.34 fghij	18.61 gh	24.27 fgh
		0.5	28.20 defghi	37.02 bcdef	28.45 bcdef	36.45 bcdef	21.08 cdefg	27.43 cdef
	100	0	23.94 lm	31.12 klm	23.94 hi	31.12 jk	16.43 hi	21.87 hi
		0.5	25.52 jkl	33.21 hijkl	24.93 ghi	32.34 hijk	20.63 defg	27.31 cdef
	150	0	19.74 n	24.94 n	17.74 j	22.94 l	0.00 j	0.00 j
		0.5	24.02 lm	31.71 jklm	24.15 ghi	31.29 ijk	13.88 i	18.52 i

*Los valores promedio con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p = 0.05$). DPT: días posteriores al trasplante.

en las hojas, además actúan en la protección de las plantas frente a diferentes estreses abióticos (D'Mello, 2015; Batista-Sánchez *et al*., 2019).

A los 40 DPT, el estudio interactivo variedades × NaCl × FitoMas-E®, mostró diferencias significativas solo para Chl a y Chl total. La respuesta a los 40 DPT fue similar que la mostrada en el análisis de los 20 DPT, el contenido de Chl a y Chl total fue más alto en Napoletano>Nufar>Emily al recibir el tratamiento con el bioestimulante y 0 mM NaCl. Este resultado puede estar determinado por el contenido de nutrientes de fácil absorción que contiene el bioestimulante, lo que facilita mayor eficiencia en los procesos metabólicos de las plantas tratadas (Calero-Hurtado *et al*., 2022). A los 40 DPT la Chl a y Chl total disminuyeron conforme las concentraciones de NaCl incrementaron, mostrando menores valores cuando las plantas de las tres variedades se encontraban sometidas a 150 mM NaCl sin FitoMas-E®. La variedad Emily presentó los valores promedio inferiores de clorofilas en todos los tratamientos (Tabla 1). Esta respuesta se puede explicar por las características de dicha variedad, catalogada como sensible a la presencia de NaCl en el medio de cultivo (Batista-Sánchez *et al*., 2015; Mazón-Suástegui *et al*., 2018).

A los 60 DPT, el análisis interactivo variedades × NaCl × FitoMas-E® mostró diferencias significativas para Chl a y Chl total. La respuesta de los pigmentos fue similar a las evaluaciones realizadas con anterioridad (20 y 40 DPT) la concentración de Chl a y Chl total en las diferentes variedades se describe en orden descendente Napoletano>Nufar>Emily en 0 mM NaCl con aplicación de FitoMas-E®. La concentración de pigmentos disminuyó desde un 7 % en Napoletano con 50 mM de NaCl y 0 FitoMas-E® hasta un 100 % en la variedad Emily con 150 mM de NaCl y 0 FitoMas-E® con respecto al tratamiento control. Con la aplicación de FitoMas-E® la Chl a y Chl total se incrementaron en las tres variedades de albahaca (Tabla 1). Los resultados encontrados para la concentración de pigmentos evaluados al aplicar el bioestimulante están relacionados con la presencia de nitrógeno en el FitoMas-E®, macronutriente que interviene directamente en la producción de clorofilas (Pulido *et al*., 2013).

De forma general los estudios entre la relación del estrés por salinidad y la concentración de pigmentos en plantas, muestran que este efecto se atribuye a la afectación de los cloroplastos y al incremento del movimiento enzimático de la clorofilasa, perturbando la formación de clorofilas (Chávez *et al*., 2015). La acumulación de pigmentos disminuyó de manera significativa en los tratamientos donde se aplicó NaCl sin el bioestimulante, con un efecto negativo más notable en el contenido de pigmentos de la variedad Emily que se caracteriza como sensible al estrés por NaCl (Batista-Sánchez *et al*., 2019). La acumulación de pigmentos se incrementó

en las plantas donde se aplicó el FitoMas-E® ya que su uso se favorece la formación de tejidos vegetales y síntesis de clorofilas, que es el pigmento encargado de captar la energía lumínica para que sea transformada en energía química, por lo tanto, una mayor cantidad de clorofilas desencadena una mayor captación de energía y por lo tanto un aumento de la tasa fotosintética (Castillo-Portela *et al*., 2011; Reyes *et al*., 2017). Estos resultados muestran la acción mitigadora del FitoMas-E® ante situaciones de estrés provocado por NaCl, con el aumento de la síntesis de sustancias capaces de mitigar el efecto provocado por este estrés abiótico. Los resultados son similares a los reportados por Reyes *et al*. (2017) en arroz, observando un incremento en los pigmentos fotosintéticos en plantas estresadas por NaCl y tratadas foliarmente con 24-epibrasinólida. Los resultados con el uso de bioestimulantes como mitigadores del estrés por NaCl, coinciden en que las plantas tratadas alcanzan promedios significativamente superiores en la concentración de pigmentos fotosintéticos, lo cual se atribuye a la posible activación de mecanismos de defensa y/o presencia de mayor disponibilidad de nutrimentos en las plantas, lo que repercute de forma positiva en los procesos fisiológicos facilitando mitigar los efectos de la salinidad por NaCl (Batista-Sánchez *et al*., 2022; Hannachi *et al*., 2022).

Tasa fotosintética

La tasa fotosintética (TF) mostró diferencias significativas a los 14, 21, 45 y 60 DPT entre variedades, NaCl y FitoMas-E®. El diferencial entre variedades se observó a los 14, 21, 45 y 60 DPT, con valores superiores en orden descendente Napoletano > Nufar > Emily en 0 mM NaCl con aplicación de FitoMas-E® para TF (Tabla 2). Estos resultados se deben a las características morfo fisiológicas de las variedades estudiadas, siendo Napoletano una variedad de hojas anchas y extendidas lo que facilita la absorción de mayor energía luminosa, seguida por la variedad Nufar y posteriormente Emily, esta última con hojas más estrechas y alargadas (Batista-Sánchez *et al*., 2019).

La respuesta de la tasa fotosintética a través del tiempo mostró una tendencia a disminuir conforme los niveles de NaCl incrementaron, con valores inferiores en todas las variedades con 150 mM NaCl sin el bioestimulante y conservando el orden Napoletano>Nufar>Emily. Se encontró un aumento de la TF en las tres variedades con 150 mM NaCl y 0.5 mL L^{-1} FitoMas-E® con respecto a 150 mM sin el bioestimulante. Como se mencionó anteriormente, a los 60 DPT, las plantas de Emily no toleraron el tratamiento de 150 mM y 0 FitoMas-E®, presentaron muerte de tejidos y no fue posible evaluar la tasa fotosintética; sin embargo, las plantas de la misma variedad en 150 mM con FitoMas-E®, presentaron tolerancia

Tabla 2. Efecto de la interacción variedades × NaCl × FitoMas-E® en la tasa fotosintética de plantas de albahaca sometidas a estrés por NaCl.
Table 2. Effect of the varieties × NaCl × FitoMas-E® interaction on the photosynthetic rate of basil plants subjected to NaCl stress.

Variedades	NaCl (mM)	FitoMas-E® (mL L^{-1})	Tasa fotosintética (µmol m^{-2} s^{-1})			
			14 DPT	21 DPT	45 DPT	60 DPT
Napoletano	0	0	19.91bcde	20.09bc	19.24bc	18.07bcd
		0.5	23.32a	24.53a	21.99a	22.84a
	50	0	18.11cdef	17.47def	17.40cdef	16.82def
		0.5	20.90abc	20.53b	20.19ab	19.70bc
	100	0	17.92def	15.32ghi	16.31efg	13.08gh
		0.5	20.56abcd	17.76de	17.82cde	15.28efg
	150	0	9.15ijk	12.71jk	12.38ijk	8.85lmn
		0.5	16.23fg	15.65fgh	14.63ghi	12.28hij
Nufar	0	0	19.26bcde	18.59cd	18.74bcd	17.60cde
		0.5	21.49ab	20.24bc	20.34ab	20.02b
	50	0	17.38ef	16.67efg	15.24fgh	11.86hijk
		0.5	20.34bcd	18.94bcd	18.39bcde	15.30efg
	100	0	8.63jkl	14.51hij	14.24ghij	9.97jklm
		0.5	19.73bcde	15.66fgh	16.40defg	12.43hi
	150	0	5.89lm	11.32k	8.97l	7.55mn
		0.5	10.99ij	14.38hij	13.18hijk	10.40ijkl
Emily	0	0	19.25bcde	17.57de	18.39bcde	14.97fg
		0.5	20.96ab	19.95bc	19.31bc	18.72bcd
	50	0	17.22ef	15.13ghi	13.49hijk	9.49klm
		0.5	20.59abcd	17.42def	17.41cdef	12.94gh
	100	0	6.42klm	13.48ij	11.38k	6.93n
		0.5	14.08gh	14.30hij	14.12ghij	10.95hijkl
	150	0	3.77m	8.99l	5.86m	0.00o
		0.5	11.61hi	12.95jk	12.15jk	2.71ñ

DPT: días posterior al trasplante. Los promedios con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p = 0.05$).

al NaCl aunque la tasa fotosintética fue menor respecto a la Napoletano y Nufar (Tabla 2).

En la fotosíntesis, de igual manera que en otros procesos metabólicos, intervienen diversos factores y su aumento está determinado por un incremento de CO_2 en las células especializadas, mediante el intercambio de gases que tiene lugar al ejecutarse la apertura y cierre estomático (Reyes *et al*., 2017). En esta investigación, la TF disminuyó significativamente en las plantas expuestas a estrés por NaCl y sin aplicar el FitoMas-E®, con una disminución de la TF de 47.9 % en la variedad Napoletano transcurridos 60 DPT, 59 % en Nufar a los 14 DPT y 92 % en Emily a los 60 DPT. Estos resultados son evidencias del efecto directo que provoca el estrés por NaCl al reducir la acumulación de CO_2 en las células especializadas por efecto del cierre estomático (Ji *et al*., 2018). Por su parte, Percey *et al*. (2016) proponen que la reducción en la fotosíntesis se debe a una inhibición en el metabolismo debido a la alteración de los mecanismos antioxidantes de las plantas. La TF de las variedades en estudio, se incrementó al aplicar de manera foliar 0.5 mL L^{-1} de FitoMas-E®. Esta respuesta es una evidencia de la acción benéfica del FitoMas-E® en las plantas mitigando el efecto directo del estrés por NaCl en la tasa fotosintética ya que está compuesto por aminoácidos precursores de la prolina, que está catalogada como un antioxidante que responde a los eventos de estrés, funciona como un osmolito en la permeabilidad de la membrana de la raíz, estabiliza las proteínas e inhibe peroxidación lipídica (Berbara y García, 2014; Batista-Sánchez *et al*., 2022). La acumulación de prolina generalmente se correlaciona con una tolerancia mayor al estrés y se ha demostrado que la aplicación exógena de compuestos de aminoácidos mejora la tolerancia a estrés biótico y abiótico en plantas superiores (Ahmad *et al*., 2016). Estos hallazgos positivos también pueden estar relacionado con el Glu existente en el bioestimulante es un aminoácido que se encuentra en las células oclusivas de los estomas y actúa como un agente osmótico para el citoplasma de las células, al proteger la integridad de la membrana celular y reducir permeabilidad para que no se rompa fácilmente y favorezca la apertura de los estomas (Berbara y García, 2014). Además, este bioestimulante tiene un efecto directo en el incremento del área foliar, permitiendo una TF mayor (Calero-Hurtado *et al*., 2022). Un estudio anterior reportado por Batista-Sánchez *et al*. (2019) mostró que, el FitoMas-E® con dosis de 0.5 ml L^{-1} incrementó el contenido de K^+, favoreciendo directamente al mecanismo de apertura y cierre estomático y de esta manera mitigó el efecto negativo del NaCl en concentraciones de 50, 100 y 150 mM de NaCl.

CONCLUSIONES

La aplicación foliar de FitoMas-E® con una dosis de 0.5 mL L^{-1} incrementó la TF a los 14, 21, 45 y 60 DPT, aún en concentraciones salinas de 100 y 150 mM. Una respuesta similar se observó en el contenido de Chl a y Chl total a los 20, 40 y 60 DPT. Estos hallazgos confirman que el FitoMas-E® estimula la concentración de clorofilas e incrementa la tasa fotosintética, lo que contribuye a mitigar los efectos nocivos de la salinidad (NaCl) en *Ocimum basilicum* cultivada bajo condiciones hidropónicas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo técnico de Pedro Luna-García, Carmen Mercado-Guido, Manuel Salvador Trasviña-Castro del CIBNOR. Esta investigación la financiaron los proyectos PAZA del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., CONACYT-PN-4631 (2017-I), SATREPS-JICA-CIBNOR-CONACYT-Tottori-University y un proyecto COSCYT (convocatoria 2023).

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

Achón-Forno, I., Paniagua-Alcaraz, P.L., Villalba-Romero, N. y Romero-Gavilán, M. 2014. Effects of the application of biostimulants on the tolerance of *Sorghum bicolor* (L.) Moench to salt stress. Investigación agraria, 16(1), 11-20.

Ahmad P., Abdel Latef A.A., Hashem A., Abd_Allah E.F., Gucel S. y Tran L.S. 2016 Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. Front. Plant Sci. 7:347 https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00347

Albuja, V., Andrade, J., Lucano, C. y Rodriguez, M. 2021. Comparison of the advantages of hydroponic systems as agricultural alternatives in urban areas. Minerva, 2(4), 45-54. https://doi.org/10.47460/minerva.v2i4.26

Batista-Sánchez, D., Nieto-Garibay, A., Alcaraz-Melendez, L., Troyo-Diéguez, E., Hernández-Montiel, L., Ojeda-Silvera, C. M. y Murillo-Amador, B. 2015. Uso del FitoMas-E® como atenuante del estrés salino (NaCl) durante la emergencia y crecimiento inicial de *Ocimum basilicum* L. Nova scientia, 7(15), 265-284.

Batista Sánchez, D., Murillo Amador, B., Nieto Garibay, A., Alcaráz Meléndez, L., Troyo Diéguez, E., Hernández Montiel, L., y Ojeda Silvera, C.M. 2017. Mitigación de NaCl por efecto de un bioestimulante en la germinación de *Ocimum basilicum* L. Terra Latinoamericana, 35(4), 309-320. https://doi.org/10.28940/terra.v35i4.317

Batista-Sánchez, D., Murillo-Amador, M., Nieto-Garibay, A., Alcaráz-Meléndez, L., Troyo-Diéguez, E., Hernández-Montiel, L.G., Ojeda-Silvera, C.M., Mazón-Suástegui, J.M. y Agüero-Fernández, Y.M. 2019. Bioestimulante derivado de caña de azúcar mitiga los efectos del estrés por NaCl en *Ocimum basilicum* L. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 6(17):297-306. doi.org/10.19136/era.a6n17.2069

Batista-Sánchez, D., Murillo Amador, B., Ojeda-Silvera, C.M., Mazón-Suástegui, J.M., Preciado-Rangel, P., Ruiz-Espinoza, F.H. y Aguero-Fernández, Y.M. 2022. Inducción de un bioestimulante y su respuesta en la actividad bioquímica de *Ocimum basilicum* L. sometida a salinidad. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 9(2). https://doi.org/10.19136/era.a9n2.3185

Barroso, L.B. 2004. Crecimiento, desarrollo y relaciones hídricas en la albahaca blanca (*Ocimum basilicum* L.) en función

del abastecimiento hídrico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana-Cuba.

Berbara, R., y García, A. 2014. Humic substances and plant defense metabolism. En: Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment. Springer, New York, USA. 1:297-319.

Calero-Hurtado, A., Quintero-Rodríguez, E., Pérez-Díaz, Y., Olivera-Viciedo, D., Peña-Calzada, K. y Jiménez-Hernández, J. 2019. Efecto entre microorganismos eficientes y fitomas-e en el incremento agroproductivo del frijol. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 17(1):25-33. https://doi.org/10.18684/bsaa.v17n1.1201

Calero-Hurtado, A., Pérez-Díaz, Y., Rodríguez-Lorenzo, M. y Rodríguez-González, V. 2022. Aplicación conjunta del consorcio microorganismos benéficos y FitoMas-E® incrementan los indicadores agronómicos del frijol. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 25(1):2252. http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.2252

Castillo-Portela, G., Villar-Delgado, J., Montano-Martínez, R., Martínez, C., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., Sánchez-Bravo, J. y Acosta-Echeverría, M. 2011. Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presentes en el FitoMas-E. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 45(1):64-67. https://www.redalyc.org/pdf/2231/223122251008.pdf

Chávez, L., Álvarez, A., Ramírez, R., Infante, S., Castro, L., García, B., García. A. y Fonseca, M. 2015. Efecto de la salinidad sobre el contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos en tres genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Agrícola, 42(3), 19-24.

Cristo-Valdés, E., González, M.C., Ventura, E. y Rodríguez, A.T. 2018. Efecto de la salinidad en estadios iniciales del desarrollo de tres cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, *39*(3), 65-70.

D'Mello, J. F. (Ed.). (2015). *Amino acids in higher plants*. CABI.

Hannachi, S., Steppe, K., Eloudi, M., Mechi, L., Bahrini, I. y Van Labeke, M.C. 2022. Salt stress induced changes in photosynthesis and metabolic profiles of one tolerant ('Bonica') and one sensitive ('Black Beauty') eggplant cultivars (*Solanum melongena* L.). Plants (Basel). 11(5):590. https://doi.org/10.3390/plants11050590

Ji, X., Cheng, J., Gong, D., Zhao, X., Qi, Y., Su, Y. y Ma, W. 2018. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga- *Scenedesmus obliquus* XJ002. Science of the Total Environment 633:593-599. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240

Lee, J.Y., Rahman, A., Behrens, J., Brennan, C., Ham, B., Kim, Won, H.S., Yun, S., Azam. H y Kwon, M. J. 2018. Nutrient removal from hydroponic wastewater by a microbial consortium and a culture of *Paracercomonas saepenatans*. New Biotechnology, 41, 15-24.

Mazón Suástegui, J. M., Murillo Amador, B., Batista Sánchez, D., Agüero Fernández, Y., García Bernal, M. y Ojeda Silvera, C.M. 2018. *Natrum muriaticum* como atenuante de la salinidad (NaCl) en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Nova scientia, 10(21), 120-136. https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1423

Mazón-Suástegui, J.M., Murillo-Amador, B., García-Bernal, M., Arcos-Ortega, G.F., Ruiz-Espinoza, F.H. y Ojeda-Silvera, C.M. 2022. Effect of *Natrum muriaticum* on photosynthesis and biomass of basil plants grown under salt stress (NaCl). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 13(28):219-229. doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3277

Montano, R., Zuaznabar, R., García, A., Viñals, M. y Villar, J. 2007. Fitomas E: Bionutriente derivado de la industria azucarera. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. XLI (3):14-21.

Murillo-Amador, B., Yamada, S., Yamaguchi, T., Rueda-Puente, E.P., Ávila-Serrano, N., García-Hernández, J.L., López-Aguilar, D.R., Troyo-Diéguez, E. y Nieto-Garibay, A. 2007. Influence of calcium silicate on growth, physiological parameters and mineral nutrition in two legume species under salt stress. Journal Agronomy Crop Science. 193:413-421. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00273.x

Ojeda-Silvera, C.M., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Troyo-Diéguez, E., Reynaldo-Escobar, M.I., Ruíz-Espinoza, F.H. y García-Hernández, J.L. 2015. Emergencia y crecimiento de plántulas de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sometidas a estrés hídrico. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 2 (5):151-161.

Pan, T., Liu, M., Kreslavski, V.D., Zharmukhamedov, S.K., Nie, C., Yu, M., Kuznetsov, V.V, Allakhverdiev, S.I. y Shabala, S. 2021. Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity. *Critical* Reviews in Environmental Science and Technology. 51(8):791-825. https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1735231

Percey, W.J., Shabala, L., Wu, Q., Su, N., Breadmore, M.C., Guijt, R.M., Jayakumar, B. y Shabala, S. 2016. Potassium retention in leaf mesophyll as an element of salinity tissue tolerance in halophytes. Plant Physiology and Biochemistry. 109:346-354. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.011

Pulido-Vega, J., Soto-Ortiz, R. y Castellanos-González, L. 2013. Efecto del Biobras y el FitoMas-E en el tomate de crecimiento indeterminado en casas de cultivo protegido. Centro Agrícola. 40(1):29-34. http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V40-Numero_1/cag061131895.pdf

Postnikova, O.A., L.G. Nemchinov. 2015. Natural antisense transcripts associated with salinity response in Alfalfa. The plant genome. 8 (2):33-39. https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.09.0057

Reyes, Y., Martínez, L., Dell´Amico, J., González, M.C., Deyholos, M. y Núñez, M. 2017. Efecto de la 24-epibrasinólida en el crecimiento y la fotosíntesis de plantas jóvenes de arroz tratadas con NaCl. Cultivos Tropicales 38(3):44-54. http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v38n3/ctr06317.pdf

Sánchez, E., Ruiz, J.M., Romero, L., Preciado-Rangel, P., Flores-Córdova, M.A. y Márquez-Quiroz, C. 2018. ¿Son los pigmentos fotosintéticos buenos indicadores de la relación del nitrógeno, fósforo y potasio en frijol ejotero? Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 5(15), 387-398 https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1757

Sánchez Govín, E., Leal López, I.M., Fuentes Hernández, L. y Rodríguez Ferrada, C.A. 2000. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). Revista Cubana de Farmacia, 34(3), 187-195.

Samperio, R.G. 1997. Hidroponía básica. Editorial Diana. 176 p.

Strain, H.H. y Svec, W.A. 1966. Extraction, separation, estimation, and isolation of the chlorophylls. In: Vernon, L.P. y G.R. Seely (Eds). The Chlorophylls. Academic Press, London. 21-66. doi.org/10.1016/B978-1-4832-3289-8.50008-4

TIBCO Software Inc. 2018. Statistica (data analysis software system), version 13. http://tibco.com.

Zörb, C., Geilfus, C.M. y Dietz, K.J. 2019. Salinity and crop yield. Plant Biology. 21:31-38. https://doi.org/10.1111/plb.12884

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Modeling radial growth of *Amylomyces rouxii* and its tolerance to selected pharmaceutical active and endrocrine disruptors compounds

Modelado del crecimiento radial de *Amyomyces rouxii* y su tolerancia a compuestos activos farmacéuticos y disruptores endócrinos seleccionados

H. Hugo León-Santiesteban[1], Estefanía P. Severo[3], Araceli Tomasini[3]*

[1] Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. ZC 02200, Delg. Azcapotzalco, Mexico City, Mexico.
[2] Posgrado en Energía y Medio Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. ZC 9340, Apdo. P. 55-535, Vicentina, Mexico City, Mexico.
[3] Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. ZC 09340, Apdo. P. 55-535, Vicentina, Mexico City, Mexico.

ABSTRACT

Filamentous fungi that tolerate the presence of toxic compounds has the potential application for their removal. In this work we studied the tolerance of *Amylomyces rouxii* to growth in presence of pharmaceutical active and endocrine disruptors compounds (PhACs and ED). Results showed that radial growth data can be modeled and used to determine the kinetic parameters to quantify fungal growth in the presence of PhACs. The capacity of *A.rouxii* to grow in the presence of 9 PhACs and 3 ED at concentrations between 100 to 5000 µg L^{-1} was evaluated. The studied PhCAs were paracetamol, ibuprofen, diclofenac, naproxen, sulfamethoxazole, trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, carbamazepine, and endocrine disruptors were β-estradiol, triclosan, and bisphenol-A. The data of *A. rouxii* radial growth was modeled using the logistic equation and linear regression. The $V_{max,}$ except in cultures with β-estradiol, and μ_{max} values were not affected by the presence of PhACs. Growth inhibition of fungus was calculated at 24 h In cultures with diclofenac, triclosan and naproxen, a linear relationship was observed between compound concentration and radial growth inhibition. However, there was no difference in radial growth inhibition at the different assayed concentrations of ibuprofen, trimethoprim, and β-estradiol. In culture with 5000 µg carbamazepine L^{-1}, growth of *A. rouxii* was completely inhibited. To the best of our knowledge, this is one the first work reporting PhACs and ED toxicity in zygomycetes.

Keywords: fungi, inhibition growth, logistic equation, microcontaminants, growth modeling.

RESUMEN

Los hongos filamentosos que toleran la presencia de compuestos tóxicos pueden potencialmente removerlos. En este trabajo se estudió la tolerancia de *Amylomyces rouxii* a crecer en presencia de compuestos activos farmacéuticos (CAFs) y disruptores endócrinos (DE). Los resultados mostraron que los datos de crecimiento radial pueden ser modelados y usados para determinar los parámetros cinéticos del crecimiento fúngico en presencia de CAFs y de DE y evaluar la inhibición del crecimiento por los CAFs. Se evaluó la capacidad de *A. rouxii* para crecer en presencia de 9 CAFs y 3 DE a concentraciones entre 100 a 5000 µg L^{-1}. Los CAFs estudiados fueron paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, sulfametoxazol, trimetoprima, ciprofloxacino, ofloxacino, carbamazepina, y los disruptores endócrinos fueron β-estradiol, triclosán y bisfenol A. Los datos del crecimiento radial de *A. rouxii* fueron modelados usando la ecuación logística y se obtuvo la tasa máxima de crecimiento. A 24 h, se calculó la inhibición del crecimiento. Ibuprofeno, trimetoprima, y β-estradiol no causaron inhibición. La carbamazepina, 5000 µg L^{-1}, inhibió completamente el crecimiento de *A. rouxii*. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que informa de la toxicidad de los CAFs y DE en hongos.

Palabras clave: hongos, , inhibición del crecimiento, ecuación logística, microcontaminantes, modelado del crecimiento.

INTRODUCTION

Filamentous fungi are widely studied due to their role in the production of secondary metabolites and enzymes of industrial importance, as well as for their capacity to remove a great diversity of xenobiotic compounds from the environment. Filamentous fungi have an important role as natural carbon compounds degraders (Tomasini and León-Satiesteban, 2019).

Fungi growth on agar plates simulates the natural growth of fungi more than in the soil. This type of cultures is mainly carried out to isolate fungi and to determine their degree of tolerance to toxic compounds by means of radial growth (Gabiatti *et al*., 2006; Crane *et al*., 2010; de Lima Souza *et al*., 2017).

In bioremediation studies, the isolation of fungi from contaminated sites and the determination of their tolerance, is a strategy that leads to obtain fungal strains with the ability to remove heavy metals and toxic compounds. For example, the effect of heavy metals, like copper, cadmium, lead, arsenic, iron, and mercury, on filamentous fungi was studied using radial growth as a parameter indicating their tolerance

*Author for correspondence: Araceli Tomasini
e-mail: atc@xanum.uam.mx
Recibido: March 14, 2024
Aceptado: June 28, 2024
Publicado: August 13, 2024

to the studied metals (Crane *et al*., 2010; Baldrian, 2003). With respect to toxic compounds, the tolerance to hydrocarbons of selected filamentous fungi was studied through radial growth, finding that *Aspergillus fumigatus* had the highest tolerance to the assayed hydrocarbons (Gabiatti Jr *et al*., 2006). On the other hand, *Rhizopus nigricans* and *Rhizopus oryzae*, isolated from pentachlorophenol (PCP)-contaminated sites, were cultured in solid medium with agar and PCP to determine their tolerance to the compounds. *R. nigricans* presented radial growth inhibition at 500 mg PCP L^{-1} (Tomasini *et al*., 2001), while *R. oryzae* grew at a concentration of 100 mg PCP L^{-1}, but radial growth was slower and 2.6-times less that the growth in cultures without PCP (León-Santiesteban *et al*., 2008).

The microcontaminants or emergent pollutants are compounds found recently in the environment at concentrations ranging from nanograms to micrograms per liter. This group of pollutants include the pharmaceutical active compounds (PhACs) and personal care products. These compounds are not toxic *per se*, since they are used by humans or animals for a beneficial purpose on health, they discharged into wastewaters through urine and feces. Finally, the PhACs reach natural water sources or the soil. Recent studies have shown that despite their low concentration in the environment, PhACs present toxic effects on some aquatic organisms such as bacteria, algae, invertebrates, and fishes; besides, the group of antibiotics can lead pathogen and non pathogen bacteria to develop resistance (Burkina *et al*., 2018; Kim *et al*., 2007; Mehinto *et al*., 2010; Santos *et al*., 2010). There are different studies on PhACs degradation by filamentous fungi such as basidiomycetes (Jelic *et al*., 2010, Cruz-Morató *et al*., 1013) and some ascomycetes (Wadhah *et al*., 2017; Olicón-Hernández *et al*., 2017). Some studies about the tolerance of filamentous fungi has been published, using mainly white-rote fungi or ascomycetes (Argumedo-Delira *et al*., 2012; Russo *et al*., 2019), but not zygomycetes.

For this reason, it is important to propose fungi that tolerate the presence of PhACs, to determine, in a future, the ability of these fungi for environmental PhACs removal. There are few publisher about PhACs toxicity to filamentous fingi.

The aim of this work was to evaluate the inhibition of radial growth of *A. rouxii* by 9 selected PhACs, paracetamol (PCT), ibuprofen (IBP), diclofenac (DCF), naproxen (NPX), sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), ciprofloxacin (CPX), ofloxacin (OFX), carbamazepine (CBZ), and 3 endocrine disrutors β-estradiol (βEDT), triclosan (TRC), and bisphenol A (BPA). Statistical analysis was made to show the effect of different concentrations of PhACs on radial growth and kinetic parameters of *A. rouxii*.

MATERIAL AND METHODS

Strain

Amylomyces rouxii CDBB-H-1883, isolated from a PCP-contaminated effluent was used in this study (Montiel *et al*., 2004). *A. rouxii* spores were produced in 250 mL Erlenmeyer flasks with 25 mL of potato dextrose agar medium (PDA) during 4 to 5 d at 30°C. Later, spores were harvested using a 1 % Tween 80 solution in water by mechanical agitation. The spore's suspension was then centrifuged at 12,000 *g* for 5 min, the supernatant formed was discarded and replaced by an equal volume of sterile distilled water, this was repeated at least three times.

Cleaned spores (0.5 mL) were utilized to inoculate PDA plates that were incubated at 30°C for 1 day. Once the incubation period had finished, 1-cm cylindrical agar plugs were removed from the center of the fungal colonies and used as inoculum for the PhACs tolerance experiments.

Target PhACs

All PhACs tested in this investigation were detected in urban and hospital wastewaters form Mexico City (Calderón *et al*., 2019). Four analgesic/anti-inflammatory compounds (PCT, IBP, DCF, and NPX), four antibiotics (TMP, SMX, OFX, and CPX), one antiepileptic (CBZ) and three endocrine disruptors (βEDT, BPA, and TRC) were assayed. PhACs with a high purity grade (> 98 %) were used, all of them purchased from Sigma-Aldrich, Mexico. A stock solution of 100 mg L^{-1} of each PhAC was prepared in a 50 % ethanol solution in water.

Culture Conditions

The radial growth of *A. rouxii* was assessed in 2X Lee agar plates. The 2X Lee agar medium contained per liter: 5 g glucose, 2.5 g $(NH_4)_2SO_4$, 5 g KH_2PO_4, 4 g $MgSO_4$, 10 g NaCl, 15 g agar, with a pH of 5.3. Before gelling, PhAC and ED were added to the culture media at different concentrations (100, 250, 1000, 1500, 2500, and 5000 µg L^{-1}). Agar plates without PhACs and ED were considered as control cultures. All agar Petri dishes (90 x 15 mm) were inoculated with a 1-cm cylindrical plug containing mycelia and were incubated at 30 °C. The radial growth of *A. rouxii* was measured, in millimeters, at different time intervals until mycelia completely invaded the Petri dishes. All cultures were carried out quadruplicated.

Kinetic Growth Model

Unstructured models were used to describe the radial growth of *A. rouxii* in the presence and absence of PhACs. Lineal regression was only used to characterize the exponential growth phase (equation 1). In contrast, Logistic equation (equation 2) was applied to model both exponential and stationary phases.

$$\frac{dR}{dt} = V_{max}X \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$\frac{dR}{dt} = \mu_{max}\left(1 - \frac{R}{R_{max}}\right)R \quad \text{(Eq. 2)}$$

Where, *dR/dt* is the radial growth rate (mm h^{-1}), *R* is the radial growth (mm), V_{max} is the maximum specific growth rate (mm h^{-1}), μ_{max} is the maximum specific growth rate (h^{-1}), and R_{max} is the maximum radial growth (mm). Parameters from lineal regression and logistic equations were estimated with the Levenberg-Marquardt method for non-linear regression

with a confidence level of 95 % using the program OriginPro 2017.

Growth Inhibition

The inhibitory effect of PhACs on the radial growth of *A. rouxii* was calculated at 24 h, during the exponential growth phase. Equation 3, reported by Sagar and Singh (2011), was used to calculate the percent inhibition of *A. rouxii* radial growth.

$$\%\ inhibition_{24h} = \frac{CR_c - CR_f}{CR_c} \cdot 100 \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Where CR_c is the radial growth in control cultures at 24 h and CR_f is the radial growth in cultures with PhACs and ED at 24 h.

Statistical Analysis

A completely randomized design (CRD) was applied to evaluate the effect of PhACs and ED concentrations on the inhibition of the radial growth of *A. rouxii* ($\alpha = 0.05$). Each CRD had seven levels related to the PhAC concentrations (0, 100, 250, 1000, 1500, 2500, and 5000 μg L^{-1}) and four replicates. The assumption of normal distribution of errors was checked by Kolomogórov-Smirnov and D'Agostino Kurtosis tests (p-value > 0.05), whereas homogeneity of variance was verified by the Levene's test. The assumption of homogeneity of variance was proved in treatments with TRC, NPX, CPX, BPA, SMX, PCT, and TRP (p-value > 0.05), thus, the HDS Tukey post hoc test was used. On the other hand, treatments with DCF, IBP, βETD, CBZ, and OFX did not meet the assumption of homogeneity of variance (p-value < 0.05), thus, they were analyzed by the Games-Howell post hoc test. All statistical tests were carried out using the software IBM SPSS Statistics 19.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Radial growth of *A. rouxii* in the presence of different PhACs and ED

The kinetics of *A. rouxii* radial growth in the presence of different PhACs and ED is shown in Figure 1. Growth was measured until the mycelium invaded the Petri dish. In the control culture, the *A. rouxii* mycelium reached 45 mm between 29 to 30 h. In cultures with PhACs and ED, the time to reach 45 mm was between 32 and 40 h, depending on the compound and their concentration. Mycelia of *A. rouxii* cultured with 100 μg L^{-1} of TRC, CPX, OFX, or BPA, invaded the Petri dishes at 29 to 30 h as in the control culture. With the other concentrations of PhACs, fungal mycelium reached 45 mm at 32 h, except with 5 000 μg L^{-1}, which was achieved until 38 h (Figure 1B, D, E, F). In the presence of the other eight PhACs and ED (DCF, NPX, CBZ, SMX, PCT, TMP, IBF, βEDT), regardless of the concentration assayed, the *A. rouxii* mycelium covered the whole Petri dish at approximately 40 h (Figure 1A, C, G, H, I, J. K, L). Each point of Figure 1 is an average of 4 experimental points.

Modeling of kinetic radial growth

In this work, the V_{max} (mm h^{-1}) and μ_{max} (h^{-1}) of *A. rouxii* radial growth were calculated using lineal regression and the logistic equation, to determine if the presence of PhACs affects these kinetic parameters. Results showed that data fitted good with lineal regression as indicated by the R^2 values (0.84 and 0.99). Statistical analysis (p-value > 0.05) showed that the V_{max} value (1.56 mm h^{-1}) of *A. rouxii* radial growth was not affected by the presence of PhACs and ED, no matter the concentration used in this study. The βETD was the only active compound that negatively affected the V_{max} of *A. rouxii* radial growth, diminishing it 1.4-times.

Data of *A. rouxii* radial growth were also fitted with the logistic equation that allowed modeling the exponential and stationary phases, as well as obtaining the μ_{max} value. Figure 2 shows the data of the control and the cultures with BPA fitted with the logistic equation.

The profile of *A. rouxii* radial growth in control cultures fitted good with the logistic model and showed a sigmoidal growth curve, $R^2 \geq 0.975$. In cultures with 100, 250, 1000, 1500, and 2500 μg L^{-1} of PhACs and ED, the growth profile was similar to the control culture and the logistic model fitted good ($R^2 \geq 0.975$). With the exception of cultures with 100 μg L^{-1} of IBP, $R^2 = 0.966$, and with 2500 μg L^{-1} of PCT, $R^2 = 0.943$, the values may be due to the experimental variation of the radial growth values.

Experimental data from cultures grown in the presence of 5000 μg L^{-1} of BPA, CPX, IBP, PCT, OFX, or TRC, fitted well using the logistic model ($R^2 \geq 0.975$). In contrast, the growth profiles of *A. rouxii* were modified when grown in the presence of 5000 μg L^{-1} of βETD, TMP, SMX, NPX, or DCF. The sigmoidal curve was not observed because most of the experimental data were mainly grouped in the lag or exponential phases and, less in the stationary phase where few experimental points were found ($R^2 \leq 0.974$), as shown in Figure 3 where it is observed the growth profile in presence of DCF. The modified growth profile of *A. rouxii* observed in the cultures with 5000 μg L^{-1}, indicate the possibility that the primary metabolism of the fungus was affected by the PhACs. That is, probably some proteins of the energy metabolism change their expression due to the presence of these compounds. Recently, it was reported that in *R. oryzae* cultures the expression of some proteins like transaldolase, hydrogenase malate, and ATP synthase, related with energy metabolism, were overexpressed in the presence of PCP (Ruiz-Lara *et al*., 2020). A hypothesis to explain why *A. rouxii* modify their growth in presence of some PhACs and ED, is that the fungus must produce more proteins for energy metabolism to cope with the effect of these compounds. However, it is necessary to study the growth of *A. rouxii* with PhACs and ED in submerged cultures to provide more information on the effect of these compounds on the metabolism and growth of the fungus.

Experimental data of *A. rouxii* radial growth in the presence of CBZ at 2500 μg L^{-1} was not fitted, $R^2 = 0.949$, indicating that at this concentration CBZ affects the growth of *A. rouxii*. At 5000 μg L^{-1} of CBZ, growth of A. *rouxii* was inhibited completely. There are some reports on CBZ toxic effects in some aquatic organisms like fish, algae and crustacean (Hai

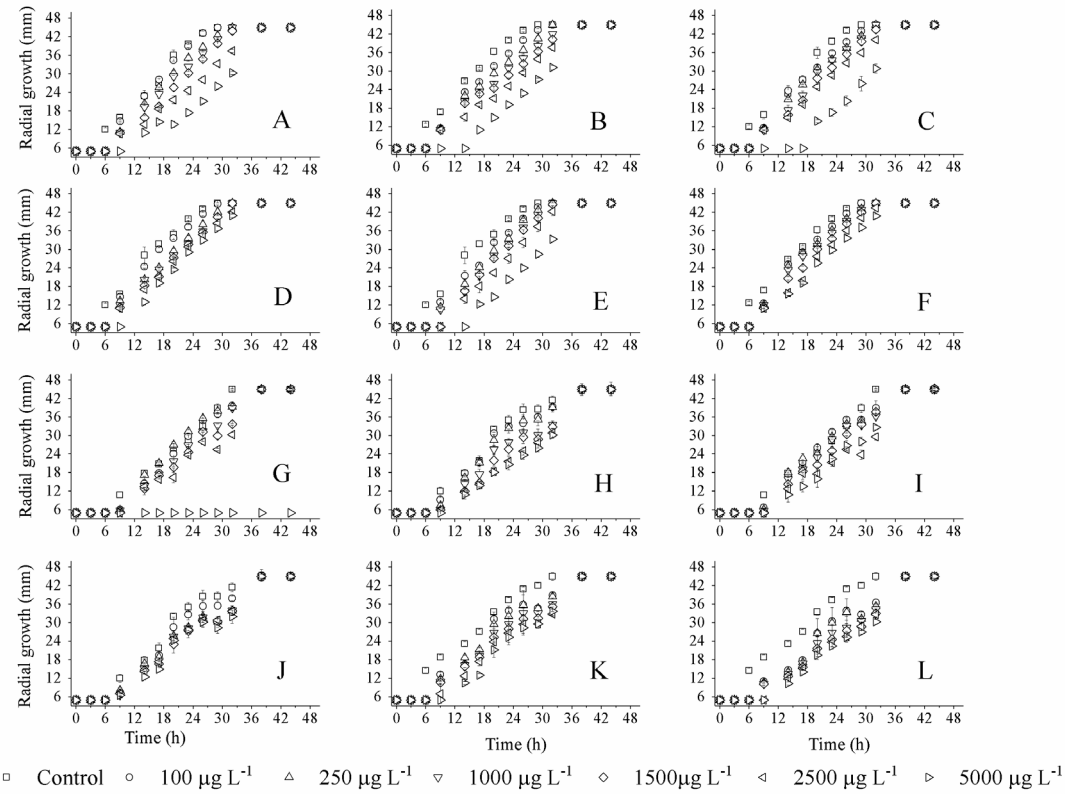


Figure 1. Kinetics of *A. rouxii* radial growth cultured without micropollutants (control) and with different PhACs and ED concentrations. A) DCF; B)TRC; C) NPX; D) CPX; E) OFX; F) BPA; G) CBZ; H) SMX; I) PCT; J) TMP; K) IBP; L) β ETD. Each point is an average of four experimental values.

Figura 1. Cinética de crecimiento radial de *A. rouxii* cultivado sin CAFs (control) y con diferentes concentraciones de CAFs. A) DCF; B)TRC; C) NPX; D) CPX; E) OFX; F) BPA; G) CBZ; H) SMX; I) PCT; J) TMP; K) IBP; L) β ETD . Cada punto es un promedio de cuatro valores experimentales.

et al., 2018; Jos *et al*., 2003; Santos *et al*., 2010). The toxicity of CBZ at concentrations of 5 to 30 mg L^{-1} has been evaluated in the *Juvenil rainbow* trout, analyzing the antioxidant response in the presence of CBZ (Li *et al*., 2011). Growth of the algae *Desmodesmus subspicatu*s was inhibited with 74 mg CBZ L^{-1}. Zhang *et al*. (2012) reported the ecotoxic effect of the CBZ in the algae *Scendesmus obliqus* and *Chlorella pyrenoidosa*, and authors proposed that CBZ could inhibit the growth of these algae. It has been shown that chlorophyll synthesis is inhibited by CBZ. The alga *Raphidocelis subcapitata* was sensitive and its growth inhibited in the presence of 100 mg CBZ L^{-1}. Growth inhibition of *Chlorella vulgaris* by CBZ has also been reported (Jos *et al*., 2003). In this work it was found that of the nine PhACs and three DE tested, CBZ was the most toxic to *A. rouxii* growth. There are some reports on CBZ degradation by basidiomycetes like *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*, but the authors did not report growth inhibition caused by the compound. This is one of the first works that reported the toxic effect of CBZ for a zigomycete fungus.

The μ_{max} values of *A. rouxii* radial growth with the logistic equation at different PhACs and ED concentrations, were calculated. Figure 4 shows the μ_{max} values for the cultures with PhACs, ED and the control cultures, without statistical differences (p-value > 0.05), independently of the concentration of the compounds, with respect to the control cultures. Except the cultures with βETD, where μ_{max} diminished 1.5-times with respect to the μ_{max} of the control culture, the V_{max} value calculated with lineal regression also showed a 1.4-fold decrease. Table 1 show the statistical analysis indicating that the confidence intervals do not touch each other. The effect of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the μ_{max} of the radial growth of *Rhizopus arrhizus* and *Trichoderma hamatum*, has been studied and authors found similar results. *T. hamatum* did not present differences in the growth μ_{max} with DDT as compared to the control culture. However, the μ_{max} for *R. arrhizus* diminished in the presence of DDT (Russo *et al*., 2019).

The lag phase during *A. rouxii* growth in the control cultures was of 3 h, and of 6 h in cultures with low PhACs concentrations (100 µg L^{-1}). In cultures with 5000 µg L^{-1} of OFX, TRC, or NPX, the lag phase was between 14 h and 17 h.

Inhibition of *A. rouxii* growth by the PhACs and ED

As was mentioned, radial growth of *A. rouxii* reached 45 mm, at different times whithin a range from 29 to 40 h. For this reason, the value of radial growth at 24 h in the exponential phase was taken to determine the of radial growth inhibition caused by PhACs and ED. Growth inhibition was calculated using equation 3. The ANOVA results, with four values of ra-

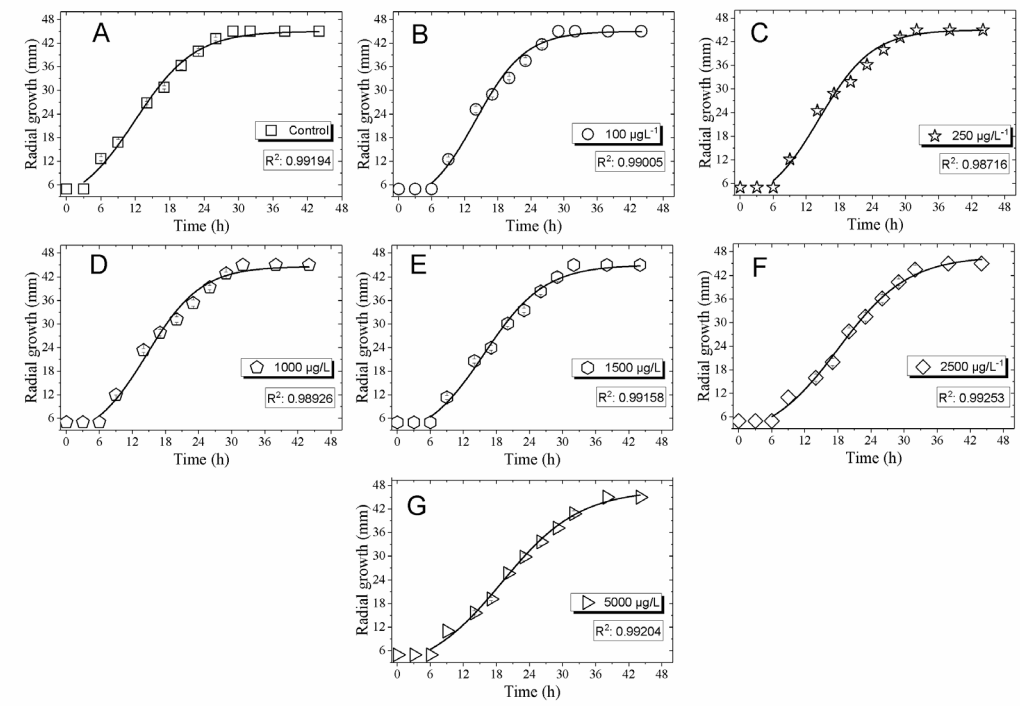


Figure 2. Radial growth of *A. rouxii* in control culture and in cultures with different BPA concentrations in µg L^{-1} (A: 0, B:100, C: 250, D: 1000, E:1500, F: 2500, G: 5000). Symbols represent the experimental data (average from 6 experimental values) and the continuous line corresponds to the fit of the logistic equation.

Figura 2 Crecimiento radial de *A. rouxii* en cultivo control y con diferentes concentraciones de BPA en µg L^{-1} (A: 0, B:100, C: 250, D: 1000, E:1500, F: 2500, G: 5000).). Los símbolos representan los datos experimentales (son promedio de 6 valores) y las líneas continuas representan los datos ajustados con la ecuación logística.

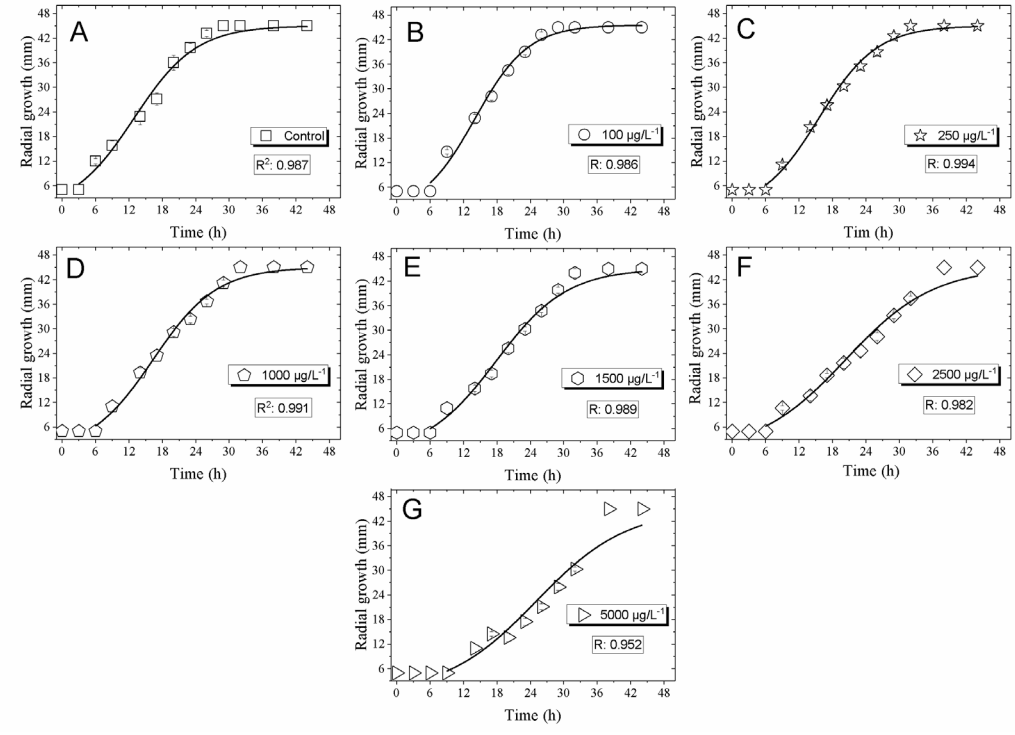


Figure 3. Radial growth of *A. rouxii* in control culture, and in cultures with different DCF concentrations in µg L^{-1} (A: 0, B:100, C: 250, D: 1000, E:1500, F: 2500, G: 5000). Symbols represent the experimental data (average from 6 experimental values) and the continuous line corresponds to the fit of the logistic equation.

Figura 3. Crecimiento radial de *A. rouxii* en cultivo control y con diferentes concentraciones de DCF en µg L^{-1} (A: 0, B:100, C: 250, D: 1000, E:1500, F: 2500, G: 5000). Los símbolos representan los datos experimentales (promedio de 6 valores) y las líneas contínuas representas los datos ajustados con la ecuación logística.

Table 1. V_{max} (mm h^{-1}) and μ_{max} values (h^{-1}), calculated by lineal regression and logistic equation respectively, of *A. rouxii* cultured at different concentrations of βETD, and the confidence intervals α = 0.05 according to ANOVA analysis.
Tabla 1. Valores de V_{max} (mm h^{-1}) y μ_{max} (h^{-1}), calculados mediante regresión lineal y ecuación logística, respectivamente, de *A. rouxii* cultivada a diferentes concentraciones de βETD, e intervalos de confidencia α = 0.05 de acuerdo a análisis ANOVA.

βETD (μg L^{-1})	V_{max} (mm h^{-1})	95 % Confidence Interval		μ_{max} (h^{-1})	95 % Confidence Interval	
		lower	upper		lower	upper
0	1.563	1.405	1.722	0.200	0.175	0.224
100	1.184	1.080	1.288	0.141	0.116	0.166
250	1.168	0.941	1.395	0.138	0.111	0.165
1000	1.063	0.967	1.159	0.125	0.104	0.147
1500	0.980	0.833	1.127	0.119	0.097	0.141
2500	1.070	0.909	1.232	0.135	0.107	0.163
5000	1.116	1.017	1.215	0.132	0.104	0.260

dial growth for each concentration, showed that treatments were statistically different. The 95 % confidence interval for each concentration mean for the nine PhACs and the three ED assayed. The HSD Tukey and Games-Howell Post Hoc tests indicated the differences in radial growth among concentrations of each compound, with a significant mean difference (p-value < 0.05).

A. rouxii was more sensitive to TRC and DCF than to the other compound tested, since radial growth inhibition showed statistical differences among all concentration assayed; six subgroups were found, according to Post Hoc Tests (Figures 5A, B). At the lowest concentration (100 μg L^{-1}), radial growth inhibition was 2.8 % and 10.8 % in cultures with DCF and TRC respectively. At 5000 μg L^{-1}, inhibition of radial growth increased 56 % and 52 % with DFC and TRC respectively. This means that, in the presence of DCF, the inhibition rate was 19.6-times higher with respect to the lowest concentration and with TCS it was 5.6-times higher.

The effect of NPX concentration on radial growth showed five subgroups according to Post Hoc Tests (Figure 5C). The inhibition rate was 10.4 and 58.3 % for 100 and 5000 μg L^{-1}, respectively, this means 5.6-times higher at 5000 μg L^{-1}.

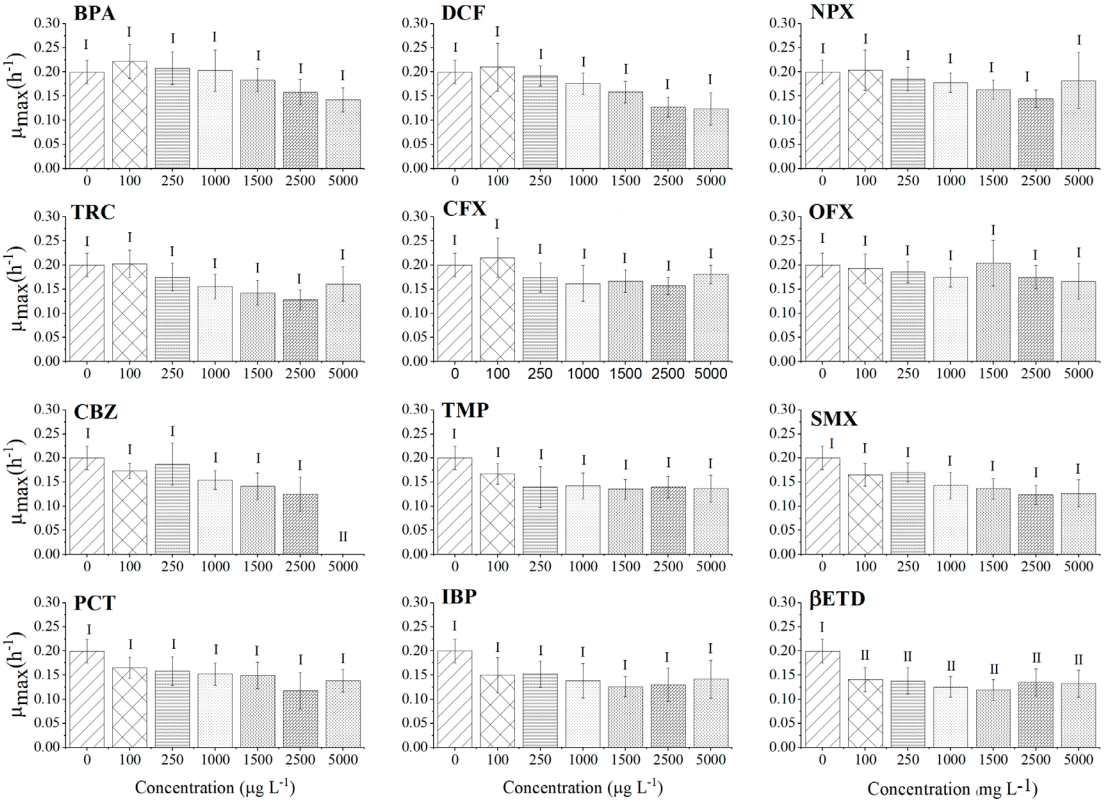


Figure 4. Values of μ_{max} (h^{-1}) calculated with the logistic equation from radial growth data of *A. rouxii* cultured with different concentrations of PhACs and ED. Different numbers indicate statistical differences according to the Post Hoc HDS (p-value > 0.05).
Figura 4. Valor de μ_{max} (h^{-1}) calculada con la ecuación logística a paritr de los datos de crecimiento radial cultivado con diferentes concentarciones de CAFS y ED. Los números diferentes indican las diferencias estadísticas de acuerdo con la prueb de Post Hoc HDS (valor-p > 0.05).

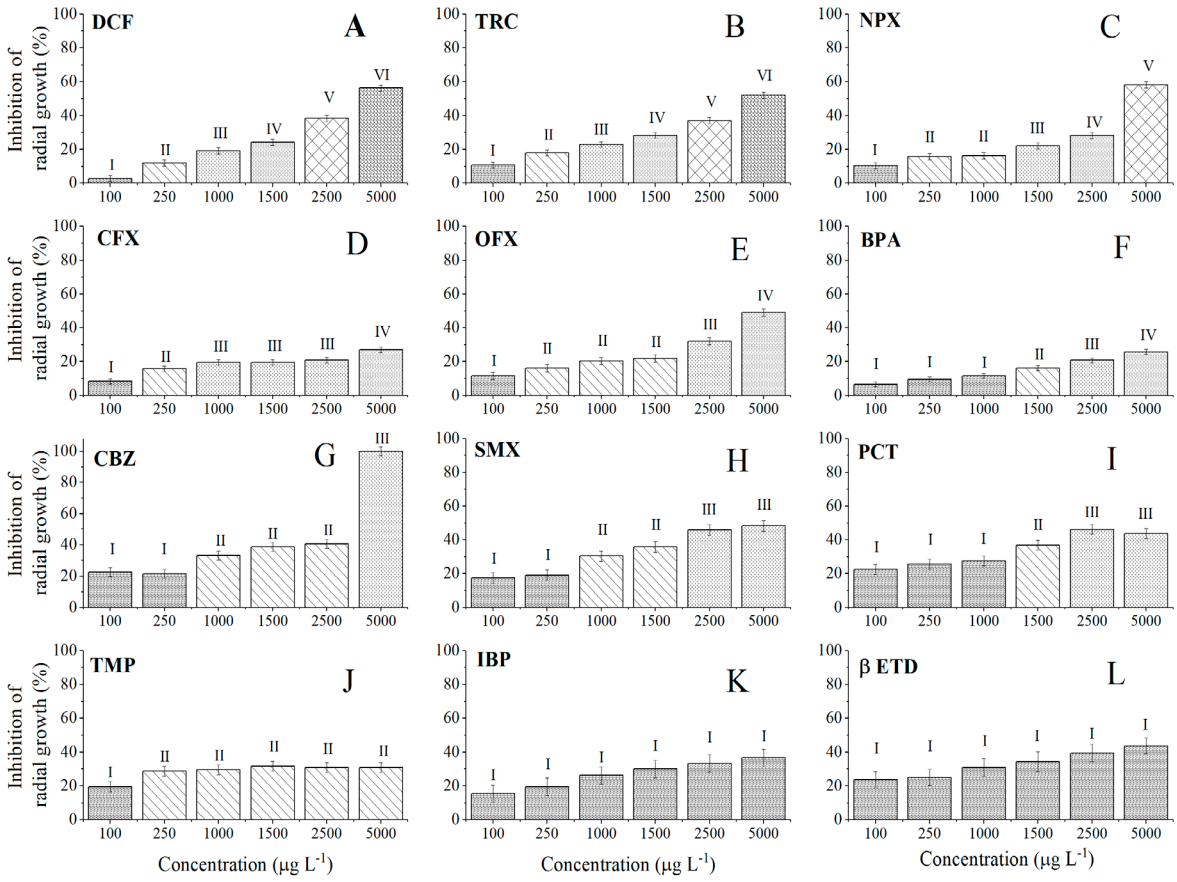


Figure 5. *A. rouxii* radial growth inhibition caused by PhACs and ED at different concentrations. Different numbers indicate statistical differences according to the Post Hoc HDS tests (p-value-p > 0.05).
Figura 5. Inhibición del crecimiento radial de *A. rouxii* causado por las diferentes cocnentraciones de los CAFs y ED. Los números diferentes indican las diferencias estadísticas de acuerdo con la prueb de Post Hoc HDS (valor-p > 0.05).

CPX, OFX, and BPA presented four subgroups with significant statistic difference. At 1000, 1500, and 2500 μg L^{-1} of CPX, *A. rouxii* presented the same inhibition rate (Figure 5D). OFX showed similar radial growth inhibition rates at 250, 1000, and 1500 μg L^{-1} (Figure 5E). Radial growth inhibition of *A. rouxii* was not different at 100, 250, and 1000 μg L^{-1} of BPA as shown in Figure 5F. *A. rouxii* was more resistant to CPX and BPA, maximal radial growth inhibition was 27 and 26 %, respectively, at 5000 μg L^{-1}; approximately 3.5-times higher with respect to the minimal concentrations tested. In cultures with 5000 μg L^{-1} OFX, inhibition rate was 32 %. The HSD Tukey and Games-Howell Post Hoc tests showed that PCT, SMX, and CBZ presented three subgroups. *A. rouxii* was sensitive to CBZ, the inhibition rate was 23 % with the lowest concentrations, 100 and 250 μg L^{-1}. In the cultures with 1000, 1500, and 2500 μg L^{-1} inhibition rates were between 33 and 42 %. *A. rouxii* did not grow in the presence of 5000 μg L^{-1} CBZ. CBZ was the only compound with an inhibition rate of 100 % (Figure 5G). Radial growth inhibition of *A. rouxii* in the presence of SMX was increased at higher concentrations; with 100 and 250 μg L^{-1}, the inhibition rate was 18 %, and 33 % with 1000 and 1500 μg L^{-1}. With the highest SMX concentrations (2500 and 5000 μg L^{-1}), the inhibition rate was 47 % (Figure 5H). PCT presented a similar inhibition rate at concentrations of 100, 250, and 1000 μg L^{-1}, around 23 %. With 1500 μg L^{-1}, the inhibition rate was 37 %. *A. rouxii* presented high radial growth inhibition, approximately 45 % in the presence of 2500 and 5000 μg L^{-1} of PCT (Figure 5I).

The last subgroup, according to the Post Hoc HDS Tukey test, practically did not show a difference in the inhibition rate calculated at any tested concentration. The TMP, IBF, and βETD are in this subgroup. In the cultures with TMP and IBP, the inhibition rate of *A. rouxii* radial growth was between 15 and 36 % at 100 to 5000 μg L^{-1}. With βETD, the inhibition rate at 100 μg L^{-1} was 24 % and 43 % with 5000 μg L^{-1} (Figure 5J, 5K, 5L). Statistical analysis showed that there are no differences.

Results showed that radial growth inhibition of *A. rouxii* depends on the type of compound and its concentration. CBZ was the only compound that completely inhibited fungal growth at 5000 μg L^{-1}. Radial growth inhibition of *A. rouxii* between 48 and 58 % was determined in the presence of 5000 μg L^{-1} of DCF, TRC, NPX, OFX, or SMX. In the presence of the other six compounds, at the highest concentration, the inhibition rate was between 25 and 43 %. Similar results have been published showing that radial growth inhibition of fungi depends on the type and concentration of toxic compound.

The radial growth inhibition of fungi by the presence of phenanthrene and pyrene has been reported. Results showed that in the presence of phenanthrene, growth inhibition was between 60 and 100 % for the concentration of 240 to 2040 µg L^{-1} for all strains except for *Hypoxylon*. Pyrene, at the same concentrations, showed almost no inhibitory effect on fungal growth, maximal radial growth inhibition was 15 to 20 % at 2040 µg L^{-1} (de Lima Souza *et al*., 2017). Authors reported that *Trichoderma* species were more resistant to phenanthrene, with radial growth inhibition of around 60 %, and only for one of the strains did the authors reported 100 % of inhibition at the highest concentration (3000 mg L^{-1}). In the presence of naphthalene, 100 % of radial growth inhibition was found for concentrations from 250 to 300 mg L^{-1} (Argumedo-Delira *et al*., 2012). Hendricks *et al*. (2017) reported radial growth inhibition in *Phyllosticta citricarpa* by the presence of the fungicide, fenbuconazole.

CONCLUSIONS

The results of this study show that *A. rouxii* radial growth depends on the type and concentration of pharmaceutical compounds. The V_{max} (except in cultures with βETD) and μ_{max} values were not affected by the presence of PhACs, indicating that these kinetic parameters were not useful to predicting growth inhibition of *A. rouxii*. In cultures with DCF and TRC, a lineal relationship was found between concentration and percent of radial growth inhibition. The lowest inhibition of growth was observed in cultures with CPX and BPA, showing little toxicity against *A. rouxii*. The different concentrations of TRP, IBP, and βETD assayed in this work did not affect the fungus radial growth. The highest toxicity was caused by CBZ, *A. rouxii* did not tolerate concentration of 5000 µg L^{-1}. This work is one of the first reports on fungal radial growth inhibition by the presence of PhACs. More studies, in submerged culture determining the consumption of nutrients and the PhACs concentration during growth kinetic, must be made to understand the toxicity effect caused by the PhACs and the mechanisms of *A. rouxii* to deal with their toxic effect.

ACKNOWLEDGMENTS

Estefanía P. Severo thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico for the fellowship number 955686.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J.J., and Peña-Cabriales, J.J. 2012. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo [*a*] pyrene. *Journal of environmental management*, 95, S291-S299.

Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme Microbial and Technologu 32, 78-91.

Burkina, V., Sakalli, S., Pilipenko, N., Zlabek, V., and Zamaratskaia, G. 2018. Effect of human pharmaceuticals common to aquatic environments on hepatic CYP1A and CYP3A-like activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An in vitro study. *Chemosphere*, 205, 380-386.

Calderón, A., Meraz, M., and Tomasini, A. 2019. Pharmaceuticals present in urban and hospital wastewaters in Mexico City. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 41(2), 105-112.

Crane, S., Dighton, J., and Barkay, T. 2010. Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. *Fungal Biol*, 114(10), 873-80.

Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozas, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., and Sarrá, M. 2013. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, 47, 5200-5210.

de Lima Souza, H.M., Barreto, L.R., da Mota, A.J., de Oliveira, L.A., dos Santos Barroso, H., and Zanotto, S.P. 2017. Tolerance to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by filamentous fungi isolated from contaminated sediment in the Amazon region. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 39(4), 481-488.

Gabiatti Jr, C., Vendruscolo, F., Piaia, J.C.Z., Rodrigues, R., Durrant, L., and Costa, J.A.V. 2006. Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 29-34.

Hai, F.I., Yang, S., Asif, M.B., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z.-Q., and Yamamoto, K. 2018. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in water: Occurrences, toxicological effects, regulations and removal by wastewater treatment technologies. *Water*, 10(2), 107.

Hendricks, K.E., Christman, M.C., and Roberts, P.D. 2017. A statistical evaluation of methods of in-vitro growth assessment for *Phyllosticta citricarpa*: average colony diameter vs. area. *PloS one*, 12(1), e0170755.

Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco Urrea, E., Sarrá, M., Perez, S., Vicent, T., Petrovic, M., and Barcelo, D. 2012. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*, 46, 955-064.

Jos, A., Repetto, G., Rios, J., Hazen, M., Molero, M., Del Peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Pérez-Martın, J., and Cameán, A. 2003. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro*, 17(5-6), 525-532.

Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.-G., and Park, J. 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370-375.

León-Santiesteban, H., Bernal, R., Fernández, F.J., and Tomasini, A. 2008. Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(10), 1394-1400.

Li, Z., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., and Randak, T. 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol Environ Saf.* , 43(3), 319-327.

Mehinto, A.C., Hill, E.M., and Tyler, C.R. 2010. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol*, 44(6), 2176-82.

Montiel, A.M., Fernández, F.J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J., and Tomasini, J. 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters*, 26, 1353-1357.

Olicón-Hernández, D.R., González-López, J., and Aranda, E. 2017. Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Front. Microbiol*. 8:1792.

Ruiz-Lara, A., Fierro, F., Carrasco, U., Oria, J.A., and Tomasini, A. 2020. Proteomic analysis of the response of *Rhizopus oryzae* ENHE to pentachlorophenol: Understanding the mechanisms for tolerance and degradation of this toxic compound. *Process Biochemistry*, 95, 242-250.

Russo, F., Ceci, A., Pinzari, F., Siciliano, A., Guida, M., Malusà, E., Tartanus, M., Miszczak, A., Maggi, O., and Persiani, A.M. 2019. Bioremediation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-contaminated agricultural soils: Potential of two autochthonous saprotrophic fungal strains. *Applied and environmental microbiology*, 85(21).

Sagar, V., and Singh, D.P. 2011. Biodegradation of lindane pesticide by non white- rots soil fungus *Fusarium* sp. *World journal of microbiology & biotechnology*, 27(8), 1747-1754.

Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., and Montenegro, M.C. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45-95.

Tomasini, A., and León-Santiesteban, H.H. (Eds.). (2019). Fungal Bioremediation: Fundamentals and Applications (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315205984. 2019. The Role of the Filamentous Fungi in Bioremediation. in: *Fungal Bioremediation: Fundamentals and Applications* (Ed.) A. Tomasini, & León-Santiesteban, H.H. , CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL pp. 3.

Tomasini, A., Flores, V., Cortés, D., and Barrios-González, J. 2001. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 201-205.

Wadhah, H.E., Abdullah, Q.Y., Naji, K.M., and AL-Kaf, A.G. 2017. Biodegradation of paracetamol by native fungal species inhabiting wastewater of a pharmaceutical factory in Sana'a, *Yemen. Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2(6): 35-41.

Zhang, W., Zhang, M., Lin, K., Sun, W., Xiong, B., Guo, M., Cui, X., and Fu, R. 2012. Eco-toxicological effect of Carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33(2), 344-352.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Impacto de la bioestimulación con nanopartículas de ZnO y el poliacrilato de potasio en la producción de pimiento bajo estrés hídrico

ZnO nanoparticles and potassium polyacrylate bioestimultation impact on pepper production under hydric stress

Jose Antonio Rios Peña[1], Alonso Méndez López[2]*, Antonio Juárez Maldonado[2], Miriam Sánchez Vega[4], Alberto Sandoval Rangel[5], Susana González Morales[6], Rebeca Betancourt Galindo[7]

[1] Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[2] Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[4] Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[5] Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[6] CONAHCYT, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[7] Departamento de materiales avanzados, Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo 140, C.P. 25294. Saltillo, Coahuila, México.

RESUMEN

El agua es un recurso esencial cuya disponibilidad va en disminución, siendo el sector agrícola uno de los principales consumidores. La nanotecnología y polímeros superabsorbentes tiene el potencial de mejorar la eficiencia en el uso del agua y facilitar la producción de alimentos en condiciones adversas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto bioestimulante de las nanopartículas de ZnO y el poliacrilato de potasio, como retenedor de agua, en la producción de pimientos bajo condiciones de estrés hídrico. Se analizaron parámetros como la eficiencia del uso del agua, el rendimiento, la calidad de los frutos, las características fisiológicas de las plantas y las propiedades del sustrato. Los tratamientos aplicados mejoraron la eficiencia en el uso del agua, incrementaron el rendimiento y redujeron la oxidación-reducción al activar el sistema de defensa antioxidante, lo que disminuyó el impacto del estrés hídrico, especialmente bajo un régimen de riego del 50 %. Estos resultados sugieren que la combinación de NPs ZnO y E. A. puede ser una estrategia efectiva para optimizar el uso del agua en la producción de pimientos. Los esultados son prometedores para un entorno controlado de invernadero. Sin embargo, se requiere realizar más investigación para confirmar estos efectos en condiciones de campo.

Palabras clave: Gestión del agua; bioestimulante; retenedor de agua.

ABSTRACT

Water is an essential resource which availability is decreasing, with the agricultural sector being one of the main consumers. Nanotechnology and superabsorbent polymers have the potential to improve water use efficiency and facilitate food production under adverse conditions. The objective of this work was to evaluate the biostimulant effect of ZnO nanoparticles and potassium polyacrylate, as a water retainer, in pepper production under water stress conditions. Parameters such as water use efficiency, yield, fruit quality, plant physiological characteristics and substrate properties were analyzed. The applied treatments improved water use efficiency, increased yield and reduced oxidation-reduction by activating the antioxidant defense system, which reduced the effects of water stress, especially under a 50 % irrigation regime. These results suggest that the combination of ZnO NPs and E. A. may be an effective strategy to optimize water use in pepper production.

Keywords: Water management; biostimulant; water retainer.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la escasez del agua se debe a la alta demanda en áreas urbanas, la sobreexplotación de acuíferos y la contaminación. El cambio climático ha empeorado la situación al reducir las lluvias, cambios de patrón o estacionalidad, lluvias torrenciales, entre otros, especialmente en regiones secas y semi secas. Esta situación impacta principalmente en la agricultura, que utiliza el 70 % del agua a nivel mundial (González-Morales y Ramón-Ojeda, 2019; Almadani y Mostafa, 2021). El déficit hídrico del suelo puede afectar negativamente a la productividad de los cultivos al alterar procesos fundamentales como la fotosíntesis, la transpiración y la apertura de estomas, lo que limita el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos (Toor *et al.*, 2020).

A nivel celular, un desequilibrio en el metabolismo de la planta puede resultar en un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una disminución del sistema de defensa antioxidante (Taha *et al.*, 2020), ocasionando alteración en la función celular normal, y en caso extremo daños irreversibles en lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Esto induce en la planta un estado de estrés oxi-

*Autor para correspondecia: Alonso Méndez López,
Correo-e: alonso1977@gmail.com
Recibido: 14 de mayo de 2024
Aceptado: 17 de septiembre de 2024
Publicado: 17 de octubre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2329

dativo celular (Calatayud *et al.*, 2015). En el pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.), un cultivo de gran importancia económica y particularmente sensibles al agotamiento de agua debido a su extensa área foliar y alta conductancia estomática, el déficit hidrico puede causar complicaciones en el cuajado de los frutos, lo que conduce a la reducción del rendimiento del cultivo (Moreno y Patricia, 2009).

Por ello, se buscan nuevas alternativas para mitigar el impacto negativo de las condiciones ambientales sobre las plantas, tal es el caso de los bioestimulantes (Du Jardin, 2015). En este sentido, las nanopartículas han demostrado mejorar el rendimiento del cultivo, reduciendo la pérdida de nutriente y los impactos ambientales negativos (Liu y Lal, 2014). Otra alternativa es el uso de polímeros superabsorbentes de agua, como el poliacrilato de potasio, para aumentar la disponibilidad y absorción de agua en el suelo (Montesano *et al.*, 2015).

La implementación de tecnologías innovadoras que mejoren la gestión del agua puede permitir a los cultivos desarrollar estrategias de tolerancia a su escasez sin afectar la producción de alimentos. Por tal razón, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto bioestimulante con nanopartículas de ZnO y el poliacrilato de potasio como retenedor de agua en la producción de pimiento bajo estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El experimento se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México, en un invernadero tipo túnel con cubierta de policarbonato, pared húmeda y ventilación mediante extractores, con coordenadas geográficas 25°35'55.13" Norte y 101°03'09.72" Oeste con 1750 msnm. Se empleó semilla de pimiento morrón *Capsicum annuum* híbrido Deseo F1 de la empresa de semillas Clause. El experimento tuvo una duración de cinco meses, desde julio hasta diciembre de 2022.

Síntesis de las nanopartículas de ZnO

Las nanopartículas de ZnO fueron sintetizadas en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). En ese proceso se empleó acetato de zinc dihidrato ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, ZnAc, 99 %), trietilamina TEA (99 %) y propilamina (99 %) como precursores en la síntesis de nanopartículas de ZnO, todos los insumos adquiridos en Sigma Aldrich. Además, se empleó etanol y agua destilada.

De acuerdo con González *et al.* (2021), se disolvieron 8.9 g de acetato de zinc dihidratado en 150 mL de agua desionizada en un matraz de tres bocas equipado con sistema de agitación y calentamiento. Se añadieron 1.78 mL de trietanolamina y 0.472 mL de n-propilamina disueltos en etanol al 99.5 %, logrando una mezcla homogénea. La reacción se llevó a cabo a 75 ºC durante 6 horas. El producto resultante se centrifugó a 15,000 rpm, se lavó tres veces con etanol y se dejó secar durante 24 h antes de su almacenamiento.

Poliacrilato de potasio

El poliacrilato de postasio fue proporcionado por Fertilex S.A. de C.V., este contiene cristales de polímeros superabsorbentes aniónicos de poliacrilamida. Son copolímeros reticulados de acrilamida y acrilato de potasio que pueden absorber hasta 400 veces su peso en agua, convirtiéndose en geles.

Determinación de las necesidades hídricas del sustratos

Para determinar las necesidades de agua de la planta, se empleó el método gravimétrico, que implica reponer el agua perdida por evapotranspiración (Segura-Castruita *et al.*, 2011). Esto se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{Evaporación} = P^1 - P^2 \qquad \text{(Ec. 1)}$$

P^1 representa el peso inicial de la maceta (después de saturarla con agua y permitir el drenaje durante 20 minutos), P^2 es el peso de la maceta después de 24 horas. El resultado final indica la cantidad de agua consumida por la planta en mililitros. Las mediciones se tomaron por la mañana (8:00 a 10:00 h) antes del inicio de la evaporación del sustrato y la transpiración de la planta. Se establecieron tres niveles de riego: 100 % (sin estrés hídrico), 50 % (estrés hídrico severo) y 25 % (estrés hídrico muy severo). Esta evaluación se realizó semanalmente y permitió ajustar los niveles de riego según la necesidad y demanda propia de la etapa fenológica de las plantas para mantener estables los tratamientos.

Procedimiento experimental en plantas de pimiento morrón

Las semillas de pimiento se germinaron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con una mezcla de peatmoss y perlita en proporción 1:1 (v/v). Tras 40 días de su emergencia, el 4 de julio de 2022 se trasplantaron a macetas de plástico negro de 10 L, manteniendo la misma mezcla de peatmoss y perlita. Durante los 150 días que duró el experimento, se aplicó una solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961) mediante riego por goteo. Cada tratamiento recibió 250 mL de riego durante los primeros 15 días posteriores al trasplante, para posteriormente mantener los tres regímenes de riego hasta finalizar el experimento.

Establecimiento del experimento

El experimento se llevó a cabo mediante un diseño de parcelas divididas en bloques completos al azar. En este diseño, el régimen de riego (100 %, 50 % y 25 %) fue asignado a la parcela principal, mientras que el tratamiento (C: control; E. A.: Poliacrilato de Potasio; NPs ZnO: Nanopartículas de Óxido de Zinc; E. A. + NPs ZnO: Poliacrilato de Potasio + Nanopartículas de Óxido de Zinc) fue asignado a la subparcela. Esto resultó en un total de 12 tratamientos con 4 repeticiones. Cada unidad experimental consistió en dos macetas, que recibieron la misma concentración y método de aplicación para las nanopartículas de ZnO y el poliacrilato de potasio. En este diseño, los dos factores de variación fueron el régimen de riego y el tratamiento aplicado.

Caracterización de las NPs ZnO
La morfología de las nanopartículas se observó utilizando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución, revelando nanopartículas esféricas de aproximadamente 20.63 nm.

Eficiencia del uso del agua
Para determinar la Eficiencia del Uso del Agua (EUA) se siguió la metodología propuesta por Fernández y Camacho (2005), modificada por Salazar-Moreno, *et. al* (2014), indicando que para evaluar EUA, se sustituye el rendimiento, ya sea por fruto o total en kg del producto por m^3 de agua utilizada.

$$\text{Ef agua} = \frac{\text{Producción (kg)}}{\text{Agua utilizada (m}^3\text{)}} \quad (2)$$

Esto se refleja directamente en los valores de EUA, donde un incremento en el rendimiento total o en el rendimiento por fruto, con el mismo consumo de agua, sugiere una mayor eficiencia en el uso del agua.

Evaluación de variables de rendimiento
La evaluación de los parámetros de productividad (rendimiento total, peso por fruto y número de frutos) comenzó 80 días después del trasplante, cuando el 50 % de los frutos habían adquirido un color amarillo brillante y estaban firmes al tacto. El peso de cada fruto se registró individualmente con una balanza digital (VINSON®) y se expresó en kilogramos. El rendimiento total se calculó sumando el peso de todos los frutos por planta.

Parámetros de calidad del fruto
La calidad del fruto se evaluó en el tercer fruto de cada planta, se midieron variables como Firmeza (FZA), sólidos solubles totales (SST), pH, potencial de oxidación-reducción (ORP), acidez titulable (AT), conductividad eléctrica (CE), diámetro polar de fruto (DP) y ecuatorial de fruto (DE). La firmeza se evaluó con un penetrómetro manual (Wagner Instruments, modelo FDK 20, Greenwich, CT, EE. UU.). Los sólidos solubles totales se determinaron a partir del extracto de fruta macerada y se leyeron con un refractometro digital (HI96801, Hanna Instruments Inc.). El pH, la conductividad eléctrica (CE) y el potencial de oxidación-reducción (ORP) se midieron utilizando un sensor digital (HANNA®). La acidez titulable se determinó utilizando 10 mL de pulpa de cada fruto, a los cuales se añadieron dos gotas de fenolftaleína al 1 %. Posteriormente, se realizó una titulación con NaOH 0.1 N hasta alcanzar el punto de viraje (color rosa) según el método descrito por la AOAC (1990). El diámetro polar y ecuatorial del fruto se midieron con un calibrador vernier (STEREN®).

Parámetros fisiológicos de la planta y propiedades físico-químicas del Sustrato
Se midió el potencial hídrico de la hoja (Ψh) utilizando una bomba de presión Scholander (Soil Moisture Equipment Corp®, Mod. 3115, Goleta, CA, EE. UU.) siguiendo la metodología de (Scholander *et al.* 1964). Las mediciones se realizaron al mediodía durante las etapas de floración y producción en hojas completamente desarrolladas. La conductividad eléctrica (CE) del sustrato se midió saturándolo con agua hasta drenaje y tomando una lectura con un potenciómetro (HANNA®).

Análisis Estadístico
El experimento constó de 12 tratamientos con 4 repeticiones (2 plantas por unidad experimental) distribuidos bajo un diseño de parcelas divididas en bloques al azar. Para el análisis de datos se utilizó el software Infostat 2020 (InfoStat 2020; Córdoba, Argentina). Se realizó un analisis de varianza (Valor de p) y en los parámetros que se detectó diferencias estadísticas significativas se aplicó una prueba de comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las NPs ZnO
El histograma muestra una distribución de tamaños de partícula de 7.5 a 42.5 nm, con un promedio de 20 nm (Figura 1) previamente reportados por García *et al*. (2023), y similar a las NPs ZnO obtenidas por Awan *et al*. (2021), principalmente esféricas con un tamaño de particula de 24 nm, lo que garantiza la estabilidad del producto.

Eficiencia del uso del agua
La eficiencia en el uso del agua, mide la cantidad de biomasa producida por unidad de agua utilizada Salazar-Moreno *et al*. (2014). La Tabla 1 presenta los resultados de la relación gramos de fruto producido por cada litro de agua consumido tanto para el rendimiento total como en el rendimiento por fruto. El análisis estadístico ($\alpha \leq 0.05$) mostró diferencias significativas en la EUA por cada fruto producido. Específicamente en las parcelas con estrés hídrico al 25 % y 50 %, tratadas con NPs ZnO y E. A.+ NPs ZnO. En la parcela al 25 %, el tratamiento E. A.+ NPs ZnO promovió una mayor EUA, logrando un rendimiento de 3.85 ± 0.09 g de fruto por litro de agua consumido por planta. Este rendimiento superó a

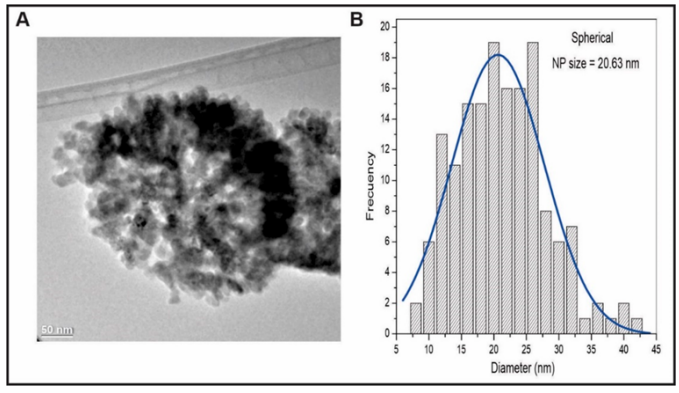


Figura 1. Morfología esférica de las nanopartículas de ZnO (A) e histograma de distribución de tamaños (B) (Magdaleno-García *et al*., 2023).
Figure 1. Spherical morphology of ZnO nanoparticles (A) and the corresponding size distribution histogram (B) (Magdaleno-García *et al*., 2023)

Tabla 1. EUA en plantas de pimiento bajo estrés hídrico, tratadas con nanopartículas de ZnO y E. A.
Table 1. WUE in pepper plants under water stress, treated with ZnO and E. A. nanoparticles.

Parcela Regimen de riego	Tratamientos	EUA/P*F (g fruit^{-1} L^{-1})	EUA/RT (g plant^{-1} L^{-1})
25 %	Control	3.39 b	14.55 bc
	E. A.	3.30 b	16.19 bc
	NPs ZnO	3.06 bc	12.49 c
	E. A.+NPs ZnO	3.85 a	18.92 abc
50 %	Control	2.69 d	20.53 abc
	E. A.	2.87 cd	26.71 ab
	NPs ZnO	3.24 b	32.11 a
	E. A.+NPs ZnO	3.17 bc	22.35 abc
100 %	Control	1.57 e	13.81 bc
	E. A.	1.65 e	18.66 bc
	NPs ZnO	1.50 e	17.27 bc
	E. A.+NPs ZnO	1.71 e	20.82 abc
	V.C. (%)	5.04	26.02
	Valor de p	0.0001	0.0893

Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Eficiencia del uso del agua (EUA); peso por fruto (P*F); rendimiento total por planta (RT); tratamientos bajo tres regímenes de riego (25 %, 50 % y 100 %); plantas con la aplicación de 5 g de un producto comercial de poliacrilato de potasio incorporado al sustrato de la maceta (E. A.); aplicación foliar de nanopartículas de ZnO a una concentración de 0.5 g L^{-1}, se realizaron seis aplicaciones con un intervalo de quince días a partir del trasplante (NPs ZnO); tratamientos combinados (E. A. + ZnO).

los tratamientos 25 % C, 50 % C y 100 % C en un 13.56 %, 43.00 % y 145.22 %, respectivamente. En la parcela con estrés del 50 %, los tratamientos con NPs ZnO y E. A. + NPs ZnO incrementaron la eficiencia del uso del agua en un 16.98 % y un 15.15 %, respectivamente, comparado con el control de la parcela al 50 %.

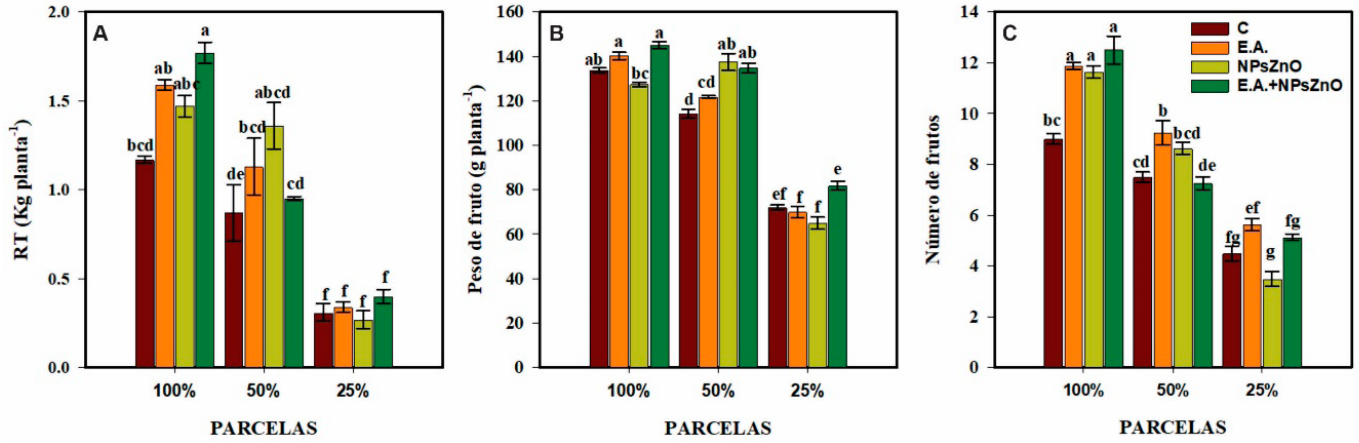
En cuanto a la EUA para el rendimiento total, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, la parcela sometida al 50 % de estrés hídrico tratada con NPs ZnO, logró una EUA de 32 ± 3.14 g de fruto por cada litro de agua utilizada en la planta superando al control sin déficit hidrico en un 132.51 %. Este resultado indica que se requieren aproximadamente 31 litros de agua para que la planta produzca un kilogramo de frutos de pimiento. Esto sugiere un impacto positivo en el rendimiento, gracias a la mejora en la eficiencia del uso del agua, promovida por la optimización de la presión osmótica atribuida a la acción de las nanopartículas de ZnO. Estudios han demostrado que las nanopartículas aplicadas en plantas mitigan el estrés inducido por el déficit de agua al promover la agregación de osmolitos, mejorando la adaptación osmótica y estimulando el equilibrio hídrico de los cultivos (Alabdallah *et al.*, 2021).

Evaluación de variables relacionadas con el rendimiento

En la Figura 2 se reportan los resultados de variables relacionados con el rendimiento. Los análisis estadísticos indican que todas las variables presentan diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$). El tratamiento más eficiente en términos de rendimiento total fue 100 % E. A. + NPs ZnO, el cual aumentó su rendimiento de frutos a 1.77 ± 0.06 kg·planta^{-1} en comparación con el control 100 % (1.17 ± 0.02 kg·planta^{-1}). En la parcela tratada al 25 % de estrés hídrico, en general se registraron los rendimientos de fruto más bajos, estos oscilaron entre 0.27 ± 0.05 y 0.40 ± 0.04 kg·planta^{-1}. En la parcela al 50 % de estrés hídrico tratada con NPs ZnO, produjo 1.36 ± 0.13 kg·planta^{-1}, superando al control en un 56 % y sin presentar diferencia estadística significativa con respecto al control al 100 %.

La variable peso del fruto mostró un efecto positivo con la aplicación de los tratamientos, ya que los frutos presentaron un mayor peso en las parcelas con un suministro hídrico del 100 % y del 50 %, siendo estadísticamente superiores a las parcelas con un suministro hídrico del 25 %. Los mayores pesos de frutos se obtuvieron con los tratamientos control 100 % (133.75 ± 1.03 g), 100 % E. A. (140.25 ± 1.65 g), 100 % E. A.+NPs ZnO (145.00 ± 1.63 g), 50 % NPs ZnO (137.5 ± 3.86 g), y 50 % E. A.+NPs ZnO (134.75 ± 2.06 g), sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ellos. En la parcela con estrés hídrico al 25 %, los frutos presentaron pesos entre 81.75 ± 1.89 g y 65.00 ± 2.74 g, lo que representa una disminución del 47.79 % en el peso promedio del fruto. Estos resultados sugieren que las nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) promueven una mayor eficiencia osmótica y una actividad fotosintética más alta en las plantas. Combinadas con la mayor capacidad de retención de agua del poliacrilato de potasio en el sustrato, las condiciones de estrés hídrico al 50 %, tratadas con nanopartículas de ZnO y E. A., permiten que los frutos alcancen pesos comparables a los obtenidos en condiciones óptimas de riego.

El número de frutos por planta se vío afactado por el régimen de estrés hídrico al que fueron sometidas las plantas y por los tratamientos. El mayor número de frutos por planta se registró en la parcela con riego al 100 %, con un incremento del 28 % de más frutos con la aplicación de E. A. + NPs ZnO, 24.25 % con E. A. y 22.62 % con NPs ZnO, respecto al control (100 % C) con 9 frutos·planta^{-1}. El menor número de fruto·planta^{-1} se registró en la parcela al 25 % con un rango de 3.50 ± 0.29 a 5.63 frutos·planta^{-1}). En la parcela con riego al 50 %, los tratamientos 50 % E. A. y 50 % NPs ZnO no presentaron diferencias estadísticas con el control al 100 %. Este resultado sugiere que tanto las nanopartículas de ZnO como el poliacrilato de potasio aplicados en condiciones de estrés hídrico



Las diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Rendimiento total (A); Peso de fruto (B); Numero de fruto (C); tratamientos bajo tres regímenes de riego (100 %, 50 % y 25 %); control (C); plantas con la aplicación de 5 g de un producto comercial de poliacrilato de potasio incorporado al sustrato de la maceta (E. A.); aplicación foliar de nanopartículas de ZnO a una concentración de 0.5 g L^{-1}, se realizaron seis aplicaciones con un intervalo de quince días a partir del trasplante (NPs ZnO); tratamientos combinados (E. A. + NPs ZnO).

Figura 2. Evaluación de la productividad en plantas de pimientos bajo estrés hídrico tratados con nanopartículas de ZnO y E. A. 2022.
Figure 2. Productivity evaluation in bell pepper plants under water stress treated with ZnO and E. A. nanoparticles. 2022.

al 50 %, tienen la capacidad de estimular la producción y alcanzar el rendimiento en condiciones óptimas de riego.

El zinc es esencial para las plantas, ya que participa en reacciones metabólicas vitales, como la síntesis de proteínas y la formación de carbohidratos durante la fotosíntesis. Además, el zinc contribuye al mantenimiento e integridad de las membranas celulares, lo que ayuda a mitigar los efectos negativos del estrés hídrico (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2023). En este sentido, Rivera-Gutiérrez *et al.* (2021) informaron un aumento del 32 % en el rendimiento del melón con aplicaciones foliares de NPs ZnO. Por otro lado, Uresti-Porras *et al.* (2021) encontraron que la aplicación foliar de NPs ZnO aumentó significativamente el peso, número y tamaño de los frutos en plantas de pimiento injertadas.

Por otro lado, los hidrogeles se han sugerido para mejorar la disponibilidad de agua y reducir el consumo hasta en un 50 % (Rivera-Fernández y Gallo, 2018). Recinos y Renato (2013) evaluaron el poliacrilato de potasio en el cultivo de frijol para mitigar el estrés por sequía, encontrando un aumento en la productividad en comparación con los tratamientos que no lo recibieron.

Evaluación de variables de calidad de fruto

Los resultados de calidad del fruto se muestran en la Tabla 2, donde todas las parcelas y tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas para las variables evaluadas, excepto para el diámetro ecuatorial. Las parcelas bajo regímenes de riego del 50 % y 100 % presentaron frutos con una firmeza promedio de 4.07 ± 0.27 a 4.63 ± 0.20 kg cm^{-2}. En la parcela al 25 %, los tratamientos E. A. + NPs ZnO y NPs ZnO superaron al control en un 31.57 % y 30.57 %, respectivamente. En la concentración de sólidos solubles totales, se observó un aumento en los frutos provenientes de plantas con déficit hídrico, indicativo de una respuesta antiestrés. Aunque se detectaron diferencias significativas en el pH y la conductividad eléctrica (CE) entre los tratamientos, no se observó una tendencia clara, lo que sugiere que estas variables también se ven afectadas por el estrés hídrico, pero no muestran una respuesta consistente a la aplicación de NPs ZnO ni al poliacrilato de potasio. La acidez titulable disminuyó en los frutos provenientes de plantas manejadas en la parcela a 100 % de regimén hídrico (a capacidad de campo), con valores entre 0.18 y 0.20 % de ácido cítrico. En la parcela a 50 % de régimen hídrico, el tratamiento con poliacrilato de potasio presentó un valor de 0.17 %, lo que representa un 29.17 % menor que su control respectivo. En esta misma parcela, para la variable diámetro polar, el tratamiento E. A. + NPs ZnO mostró un calibre similar al control de 50 % y ambos no presentaron diferencias estadísticas con el control de la parcela con riego al 100 % (6.93 cm).

El estrés en las plantas ocasionado por la salinidad del suelo, afecta la calidad de los frutos. Un ejemplo de ello se presentó en tomates cultivados en suelos con una conductividad eléctrica de 8 dS m^{-1}, como respuesta los frutos presentaron un aumento en los niveles de azúcares y ácido cítrico (Navarro-López *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso de algunos bioestimulantes como sustancias húmicas logran reducir la acidez titulable, mejorando así el sabor y la calidad nutricional de los frutos (Villegas-Espinoza *et al.*, 2018).

El ORP, es un parámetro que indica la capacidad antioxidante y es clave en la calidad del fruto (Cano-Hernández *et al.*, 2016). En las plantas manejadas en la parcela en condición de 25 % de suministro hidríco, el poder antioxidante de los frutos se vió ampliamente afectado. Efecto contrario se observó en los frutos provenientes de plantas con 50 % de estrés hídrico, el tratamiento testigo presentó un ORP de -3.50 ± 0.50 mV, en esta misma parcela, los tratamientos con NPs ZnO (-21.75 ± 0.48 mV), E. A. (-25 ± 0.91 mV) y su combinación (-14.75 ± 0.25 mV) mostraron valores más bajos, lo que indica una menor oxido-reducción, mejorando la calidad nutracéutica de los frutos. Estudios sugieren que las nanopartículas aumentan compuestos bioactivos como

fenoles y flavonoides en frutos bajo condiciones de estrés (Montaño-Herrera, 2023). Además, estudios indican que el uso de polímeros superabsorbentes mejoran la calidad y rendimiento de los frutos en plantas de tomate, aumentando nutrientes, pigmentos y hormonas, así como reduciendo la peroxidación lipídica y el contenido de peróxido de hidrógeno (Başak, 2020).

Variables fisiológicas de la planta y propiedades fisicoquímicas del sustrato

La condición de sequía elevan la salinidad del suelo, lo que provoca un desequilibrio osmótico y en el potencial hídrico, afectando el contenido de agua en las plantas. Para compensar la pérdida de agua, las plantas mantienen un potencial hídrico más negativo que el sustrato para facilitar la absorción (Rodríguez-Ledesma *et al.*, 2019). En la figura 3 se presentan los resultados del potencial hídrico foliar durante las etapas de floración y producción, junto con la conductividad eléctrica del sustrato. Se detectan diferencias significativas en el potencial hídrico en ambas etapas según el análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$). Durante la floración, en la parcela a 25 % de suministro hídrico, el tratamiento control experimentó una disminución de -5.73 ± 0.45 MPa mientras que los tratamientos E. A., E. A. + NPs ZnO y NPs ZnO registraron valores de -3.03 ± 0.08, -2.98 ± 0.32 y -1.98 ± 0.20 MPa, en comparación con representa un aumento del 47.13 %, 48.0 % y un 65.45 %, respectivamente. En la parcela a 50 % de suministro hídrico, los tratamientos con NPs ZnO y E. A., presentaron un aumento del 28.61 % y 47.68 % con respecto al control correspondiente. En tanto que, en la parcela al 100 %, el tratamiento con NPs ZnO aumento el potencial hídrico foliar en un 52.17 % en comparación con el control correspondiente.

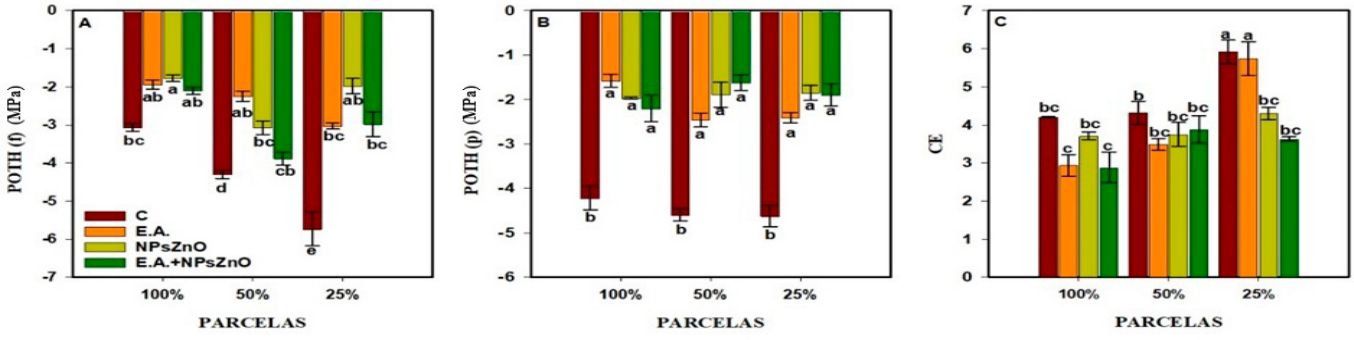
Para la etapa de producción, se muestra una disminución significativa en el tratamiento control en las tres parcelas (25 %, 50 % y 100 %), con valores promedio de - 4.62 ± 0.24, - 4.60 ± 0.14 y - 4.22 ± 0.27 MPa respectivamente. En contraste, las plantas tratados con NPs ZnO y poliacrilato de potasio, tanto en forma individual como en combinación, mantuvieron un potencial hídrico estable, oscilando entre - 1.58 ± 0.15 y - 2.46 ± 0.16 MPa.

Las NPs ZnO mejoran la tolerancia al estrés hídrico al activar el sistema de defensa antioxidante en las plantas permitiendo la disminución de la expresión de ROS mejorando la calidad de los frutos. En este sentido, los compuestos fenólicos juegan un papel importante en el sistema no enzimático (Magdaleno-García *et al.*, 2023). Cuando la planta sufre estrés por metales pesados, en este caso debido a las NPs ZnO, los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes quelantes de metales o suprimir las ROS (Michalak, 2006; Magdaleno-García *et al*., 2023). Por otro lado, los nanocompuestos Grafeno-Cu en tomates bajo estrés biotíco infectados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* demostró mejorar hasta un 31.7 % el potencial hídrico (Cota-Ungson *et al.*, 2023).

El poliacrilato de potasio, un polímero superabsorbente, reduce el estrés hídrico al liberar gradualmente agua durante el crecimiento de las plantas. Según Liu y Chan (2015), su uso en el suelo aumenta el contenido de agua y la supervivencia del pasto Bermuda en invernadero.

Se observa un aumento en la CE del sustrato en tratamientos con mayor restricción de agua; sin embargo, disminuye en los tratamientos con aplicación de E. A., siendo más baja en la parcela a 100 % y más alta en la parcela al 25 %. Los tratamientos 100 % E. A. y 100 % E. A. + NPs ZnO lograron una disminución del 31.95 % y 33.34 %, comparado con el control de la parcela al 100 %; mientras que los tratamientos en la parcela al 50 % de riego no mostraron una diferencia significativa.

El pimiento prefiere suelos bien aireados pero es sensible a la salinidad, lo que afecta el rendimiento si la CE supera los 3.4 dS m^{-1} (Yagudin y Rolandovich, 2018). Los hidrogeles, como enmiendas, mejoran las propiedades físicas del suelo, reduciendo la CE y la pérdida de agua por percolación o eva-



Las diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Potencial hidrico en etapa de floración (A); potencial hidrico en etapa de producción (B); conductividad electrica del sustrato (CE); tratamientos bajo tres regímenes de riego (100 %, 50 % y 25 %); control (C); plantas con la aplicación de 5 g de un producto comercial de poliacrilato de potasio incorporado al sustrato de la maceta (E. A.); Aplicación foliar de nanopartículas de ZnO a una concentración de 0.5 g L^{-1}, se realizaron seis aplicaciones con un intervalo de quince días a partir del trasplante (NPs ZnO); tratamientos combinados (E. A. + NPs ZnO).

Figura 3. Evaluación de variables fisiológicas de la planta y propiedades fisicoquímicas del sustrato.
Figure 3. Evaluation of physiological parameters of the plant and physicochemical properties of the substrate.

Tabla 2. Evaluación de parámetros de calidad del fruto en plantas de pimiento bajo estrés hídrico tratadas con nanopartículas de ZnO y E. A.
Table 2. Evaluation of fruit quality parameters in bell pepper plants under water stress treated with ZnO and E. A. nanoparticles.

Parcela Regimen de riego	Tratamiento	FZA (kg cm^{-2})	SST (°Brix)	pH	ORP	AT (% ac. cítrico)	CE	DP (cm^{-1})	DE (cm^{-1})
25 %	Control	2.84 c	7.05 a	5.35 ab	-6.75 b	0.28 ab	1.93 e	5.38 d	5.83 c
	E. A.	3.46 bc	7.15 a	5.36 ab	-6.00 ab	0.27 abc	3.05 ab	5.50 d	5.83 c
	NPs ZnO	4.09 ab	6.90 ab	5.37 ab	-4.00 a	0.24 a-e	3.08 abc	6.50 bcd	6.20 abc
	E. A.+NPs ZnO	4.15 ab	7.15 a	5.30 ab	-5.00 ab	0.31 a	3.28 ab	6.78 abc	6.28 abc
50 %	Control	3.77 ab	6.18 bc	5.11 b	-3.50 a	0.25 a-d	3.44 a	7.93 a	7.13 a
	E. A.	4.40 a	4.88 d	5.50 a	-25 f	0.17 e	2.93 ab	5.50 d	5.98 bc
	NPs ZnO	4.07 ab	5.35 cd	5.36 ab	-21.75 ef	0.21 b-e	2.76 bcd	6.13 cd	6.15 abc
	E. A.+NPs ZnO	4.37 ab	5.60 cd	5.42 a	-14.75 cd	0.24 b-e	3.17 abc	7.45 ab	6.48 abc
100 %	Control	4.35 ab	5.50 cd	5.32 ab	-13.75 cd	0.19 de	2.60 cd	6.93 abc	6.65 abc
	E. A.	4.46 a	4.40 e	5.39 ab	-10.50 bc	0.18 e	2.61 cd	7.80 a	6.85 abc
	NPs ZnO	4.63 a	4.80 de	5.35 ab	-18.00 de	0.18 e	2.92 ab	7.00 abc	7.13 a
	E. A.+NPs ZnO	4.61 a	5.00 de	5.48 a	-13.00 cd	0.20 cde	2.45 de	7.63 ab	6.95 ab
	C.V. (%)	8.46	5.36	2.19	19.36	12.27	8.20	7.21	6.46
	Valor de p	0.0048	0.0003	0.0468	0.0001	0.0158	0.0001	0.0114	0.1348

Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Firmeza (FZA); solidos solubles totales (SST); potencial de hidrogeno (pH); potencial de oxidación-reducción (ORP); acides titulable (AT); conductividad electrica (CE); diámetro polar (DP); diámetro ecuatorial (DE); tratamientos bajo tres regímenes de riego (25 %, 50 % y 100 %); plantas con la aplicación de 5 g de un producto comercial de poliacrilato de potasio incorporado al sustrato de la maceta (E. A.); aplicación foliar de nanopartículas de ZnO a una concentración de 0.5 g L^{-1}, se realizaron seis aplicaciones con un intervalo de quince días a partir del trasplante (NPs ZnO); tratamientos combinados (E. A. + NPs ZnO).

poración (Gómez, 2015).

CONCLUSIONES

La aplicación de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) y el poliacrilato de potasio (E. A.), ya sea de manera individual o combinada, tiene efectos positivos en la mitigación del estrés hídrico en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Las NPs ZnO fomentaron la tolerancia al estrés hídrico al regular el metabolismo de las plantas, mientras que el poliacrilato de potasio contribuyó a la retención de agua en el sustrato, reduciendo los efectos adversos del déficit hídrico. Ambos tratamientos mejoraron la eficiencia en el uso del agua, incrementaron el rendimiento de frutos por litro de agua utilizada, especialmente bajo condiciones de riego al 50 %. Además, la aplicación de NPs ZnO y E. A. redujo la oxido-reducción y mejoró la calidad nutracéutica de los frutos, evidenciando un aumento en la capacidad antioxidante. El uso de polímeros superabsorbentes, también, redujo la conductividad eléctrica del suelo, previno la acumulación de sales y mejoró la disponibilidad de agua para los procesos metabólicos de las plantas. Sin embargo, se requieren más análisis para precisar el impacto de los tratamientos, particularmente en relación con el suministro de agua. Se recomienda explorar diferentes concentraciones de NPs ZnO y E. A. para identificar las condiciones óptimas que maximicen la eficiencia hídrica en la producción de alimentos, dado el creciente problema de escasez de este recurso vital.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo brindado a través de una beca. Este respaldo financiero fue crucial para llevar a cabo la investigación presentada en este artículo. Su contribución ha sido invaluable y nos ha permitido avanzar en el conocimiento científico en nuestro campo de estudio.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

AOAC. 1990. Official methods of analysis: in K. Helrich (Ed.). 15th ed. Arlington, VA, USA.

Alabdallah, N.M. Hasan, M.M., Hammami, I., Alghamdi, A.I., Alshehri, D. y Alatawi, H.A. 2021. Green synthesized metal oxide nanoparticles mediate growth regulation and physiology of crop plants under drought stress. Plants. 10(8): 1730.

Almadani, B. y Mostafa, S.M. 2021. IIoT based multimodal communication model for agriculture and agro-industries. IEEE Access. 9: 10070-10088.

Awan, S., Shahzadi, K., Javad, S., Tariq, A., Ahmad, A., y Ilyas, S. 2021. A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea* var italic. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 20(1): 18-24.

Başak, H. 2020. The effects of super absorbent polymer application on the physiological and biochemical properties

of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown by soilless agriculture technique. Applied Ecology and Environmental Research. 18(4):5907-5921.

Calatayud, Á., Penella, C., Penella, V., Marsal, J.I., Bonet, L., Nebauer, S.G. y López-Galarza, S. 2015. Respuesta de las plantas injertadas de pimiento en condiciones de estrés hídrico. Influencia del injerto y del patrón. Agrícola Vergel. 381: 84-86.

Cano-Hernández, M., Bennet-Eaton, A., Silva-Guerrero, E., Robles-González, S., Sainos-Aguirre, S. y Castorena-García, H. 2016. Caracterización de bioles de la fermentación anaeróbica de excretas bovinas y porcinas. Agrociencia. 50(4): 471-479.

Cota-Ungson, D., González-García, Y., Cadenas-Pliego, G., Alpuche-Solís, Á.G., Benavides-Mendoza, A. y Juárez-Maldonado, A. 2023. Graphene–Cu nanocomposites induce tolerance against *Fusarium oxysporum,* increase antioxidant activity, and decrease stress in tomato plants. Plants. 12(12): 2270.

Du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Scientia Horticulturae. 196: 3-14.

Magdaleno-García, G., Juárez-Maldonado, A., Betancourt-Galindo, R., González-Morales, S., Sánchez-Vega, M. y Méndez-Lopez, A. 2023. Zinc oxide nanoparticle morphology modify germination and early growth of bell pepper seedlings: Zinc oxide nanoparticle morphology. Biotecnia. 25(3): 5-15.

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.

Gómez, J.S. 2015. Characterization and effects of cross-linked potassium polyacrylate as soil amendment. University of Seville. Seville, Spain.

González, S.E., Bolaina-Lorenzo, E., Pérez-Trujillo, J.J., Puente-Urbina, B.A., Rodríguez-Fernández, O., Fonseca-García, A., y Betancourt-Galindo, R. 2021. Antibacterial and anticancer activity of ZnO with different morphologies: a comparative study. 3 Biotech. 11: 1-12.

González-Morales, A. y Ramón-Ojeda, A.Á. 2019. La desalación de agua de mar en las Canarias Orientales: los casos de Lanzarote y Fuerteventura. Agua y Territorio / Water and Landscape. 13: 15-26.

Liu, R. y Lal, R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). Scientific Reports, 4(1): 5686.

Liu, X. y Chan, Z. 2015. Application of potassium polyacrylate increases soil water status and improves growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) under drought stress condition. Scientia Horticulturae. 197: 705-711.

Montaño-Herrera, A. 2023. Efecto de la fertilización edáfica y aplicación foliar con nanopartículas de Cu, Se, Fe, y Zn sobre el rendimiento y calidad poscosecha de *Malus domestica* L. y *Pyrus communis* L. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Montesano, F.F., Parente, A., Santamaria, P., Sannino, A., y Serio, F. 2015. Biodegradable superabsorbent hydrogel increaseswater retention properties of growing media and plant growth. Agriculture and Agricultural Science Procedia. 4: 451-458.

Moreno, F. y Patricia, L. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. Agronomía Colombiana, 27(2): 179-191.

Navarro-López, E.R., Nieto-Ángel, R., Corrales-García, J., García-Mateos, M.D.R. y Ramírez-Arias, A. 2012. Calidad poscosecha en frutos de tomate hidropónico producidos con agua residual y de pozo. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 18(3): 263-277.

Ramírez-Rodríguez, S.C., Ortega-Ortiz, H., González-Morales, S. y Preciado-Rangel, P. 2023. Nanopartículas de quitosán mejoran el rendimiento, actividad enzimática y compuestos bioactivos en frutos de tomate. Revista Terra Latinoamericana, 41.

Recinos, A. y Renato, J. 2013. Evaluación del poliacrilato de potasio, en el cultivo de frijol *(Phaseolus vulgaris* L.), como práctica de adaptación a la amenaza de sequía, Parramos, Chimaltenango. Doctoral dissertation. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Rivera-Fernández, R.D. y Gallo, F.M. 2018. Absorción de agua de hidrogel de uso agrícola y su humedecimiento de tres tipos de suelo. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. 50(2): 15-21.

Rivera-Gutiérrez, R.G., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Betancourt-Galindo, R., Yescas-Coronado, P. y Orozco-Vidal, J.A. 2021. Nanoparticulas de óxido de zinc y su efecto en el rendimiento y calidad de melón. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 12(5): 791-803.

Rodríguez-Ledesma, N.D., Torres-Sevillano, C.N., Chaman-Medina, M.E. y Hidalgo-Rodríguez, J.E.M. 2019. Efecto del estrés salino en el crecimiento y contenido relativo del agua en las variedades IR-43 y amazonas de *Oryza sativa* "arroz" (Poaceae). Arnaldoa, 26(3): 931-942.

Salazar-Moreno, R., Rojano-Aguilar, A. y López-Cruz, I.L. 2014. La eficiencia en el uso del agua en la agricultura controlada. Tecnología y Ciencias del Agua. 5(2): 177-183.

Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A. y Bradstreet, E.D. 1964. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 52(1): 119-125.

Segura-Castruita, M.Á., Ramírez-Seañez, A.R., García-Legaspi, G., Preciado-Rangel, P., García-Hernández, J.L., Yescas-Coronado, P., Fortis-Hernández, M., Orozco-Vidal, J.A. y Montemayor-Trejo, J.A. 2011. Desarrollo de plantas de tomate en un sustrato de arena-pómez con tres diferentes frecuencias de riego. Revista Chapingo. Serie horticultura, 17(SPE1): 25-31.

Steiner, A.A. 1961.A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant and Soil. 15: 134-154.

Taha, R.S., Alharby, H.F., Bamagoos, A.A., Medani, R.A. y Rady, M.M. 2020. Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense system. South African Journal of Botany. 128: 42-53.

Toor, M.D., Adnan, M., Javed, M.S., Habibah, U., Arshad, A., Din, M.M. y Ahmad, R. 2020. Foliar application of Zn: Best way to mitigate drought stress in plants; A review. International Journal of Applied Research. 6(8): 16-20.

Uresti-Porras, J.G., Cabrera-De-La Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., Olivares-Sáenz, E., Cabrera, R.I. y Juárez-Maldonado, A. 2021. Effect of graft and nano ZnO on nutraceutical and mineral content in bell pepper. Plants. 10(12): 2793.

Villegas-Espinoza, J.A., Reyes-Pérez, J.J., Nieto-Garibay, A., Ruiz-Espinoza, F.H., Cruz-Falcón, A. y Murillo-Amador, B. 2018. Biostimulant Liplant®: its effect on *Solanum lycopersicum* (L.) grown on slightly saline soils. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9(SPE20): 4137-4147.

Yagudin, H. y Rolandovich, I. 2018. Efecto de la aplicación de microorganismos eficientes (me) y fitomas-e ® en la producción de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum L*). Thesis. Universidad de Matanzas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Perception and use of herbal medicine in Hermosillo, Sonora (Northwest Mexico)

Percepción y uso de la medicina herbolaria en Hermosillo, Sonora (noroeste de México)

Ildefonso Guerrero-Encinas[1], Javier N. González-González[1], Gloria G. Morales-Figueroa[1], Jesús F. Ayala-Zavala[1], Marco A. López-Mata[2], Ana I. Ledesma-Osuna[3], Gustavo A. González-Aguilar[1], Raymundo R. Rivas-Cáceres[4], Luis Quihui-Cota[1]*

[1] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Col. La Victoria 83304. Hermosillo, Sonora, Mexico.
[2] Universidad de Sonora, Campus Hermosillo, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico.
[3] Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. Bordo Nuevo S/N, 85040, Antiguo Providencia, Cd. Obregón, Sonora, Mexico.
[4] Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Av. Plutarco Elías Calles 1210, Alfa, 32310 Juárez, Chihuahua, Mexico.

ABSTRACT

Using herbal resources for medicinal purposes has persisted across diverse cultures, harnessing potential bioactivities. Despite the availability of commercial drugs, populations, including those in Mexico, continue to integrate herbal medicine into their healthcare practices. This study on Hermosillo, city in Northwest Mexico, explored the prevalence and patterns of herbal medicine use. A cross-sectional study was conducted from May to September 2023, surveying 441 residents through a structured questionnaire. Demographic characteristics, awareness, and experiences with herbal medicine were assessed. Most participants were female (67.57 %), age 30 years old or younger (67.57 %), and urban residents (90.70 %). The family was the primary source of knowledge for herbal medicine (73.92 %), emphasizing cultural continuity. Most participants (93.65 %) used herbal medicine when regarded as necessary, with 57.59 % reporting partial success. Despite reservations about safety (41.59 %), concurrent use with conventional treatments was common. The study underscores the persistent cultural connection to herbal medicine in families of Hermosillo. Awareness campaigns emphasizing responsible herbal medicine use, especially in vulnerable groups, are crucial. These findings contribute to a broader understanding of herbal medicine trends and practices, emphasizing the importance of local perspectives.
Keywords: herbal resources; alternative medicine; herbal knowledge.

RESUMEN

El uso de recursos herbolarios medicinales ha persistido en diversas culturas, aprovechando posibles bioactividades. A pesar de los medicamentos comerciales disponibles, las poblaciones, incluyendo México, siguen usando hierbas en cuidados de salud. Este estudio en Hermosillo, ciudad del noroeste de México, explora la prevalencia y uso de medicina herbolaria. Se realizó un estudio transversal de mayo a septiembre de 2023, encuestando a 441 residentes mediante cuestionarios estructurados. Se evaluaron características demográficas, conocimiento y experiencias con medicina herbolaria. La mayoría de los participantes fueron mujeres (68.56 %), menores de 30 años (67.12 %) y residentes urbanos (90.82 %). La familia fue la principal fuente de conocimientos sobre fitoterapia (73.7 %), destacando la continuidad cultural. El 93 % de los participantes utilizaron hierbas medicinales cuando lo consideraron necesario, y el 56.9 % informó éxito parcial. A pesar de las reservas sobre su seguridad (41.6 %), el uso simultáneo con tratamientos convencionales fue común (48.1 %). El estudio subraya la conexión cultural entre medicina herbolaria y familias mexicanas. Son necesarias campañas de sensibilización fomentando el uso responsable de medicinas herbolarias, especialmente en grupos vulnerables. Los hallazgos comparten una comprensión más amplia de tendencias y prácticas de la medicina herbolaria, enfatizando las perspectivas locales.
Palabras clave: recursos herbolarios; medicina alternativa; conocimientos herbolarios.

INTRODUCTION

Herbal resources have been used by humankind worldwide for years, often in undiscovered forms. Numerous plants contain metabolites with potential biological activities, including hepatoprotective, antitumor, antioxidant, and antimicrobial properties (Veiga *et al*., 2008). In this regard, plants have traditionally been employed to treat or cure diseases (Armendáriz-Barragán *et al*., 2016). Despite the availability of a wide array of commercial drugs, some communities continue to incorporate herbal medicine into their daily lives (Al Akeel *et al*., 2018). It is estimated that the use of herbal medicine has increased over the last decade at specific regions worldwide, potentially influenced by regional cultural factors (Welz *et al*., 2019).

Based on this, there have been comparisons regarding the use of traditional herbal medicine between different regions, such as China, and North American indigenous

*Author for correspondence: Luis Quihui Cota
e-mail: lquihui@ciad.mx
Received: March 7, 2024
Accepted: May 17, 2024
Published: July 1, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2284

communities like the Chumash, which has historically inhabited coastal areas of California (USA). Despite belonging to geographically distinct regions, these communities have similarities in the therapeutic use of plants (Adams *et al*., 2010).

On the other hand, the use of medicinal plants in Mexico is an integral part of its culture, being the second country with the most registered medicinal plants (Rojas *et al*., 2022). In Central-Western Mexico, around 59.2 % of the population was estimated to use herbal resources to treat type 2 diabetes mellitus (Rodriguez-Fragoso *et al*., 2008; Ruiz-Noa *et al*., 2021). Similarly, an estimated 14.6 % of pregnant women residing in the central region of Mexico used herbal remedies (Alonso-Castro *et al*., 2018). Nevertheless, variations in practice and knowledge about herbal medicine may be region-dependent (Hopkins, 2011). Aligned with this perspective, in Mexico, some ethnic communities living at different areas and diverse environments, use plants from their surroundings to meet multiple needs, including their health improvement. Some of these practices are inherited generationally, and some persist, while others are forgotten (Cruz-Perez *et al*., 2021). Despite sharing Mexican traditions, cultural differences, particularly in the Northern part of the country, are due to factors such as its proximity to the United States and environmental conditions. However, the information about the frequency and practice of herbal medicine in each region of the country, specifically in the Northwest, is limited. This study aimed to survey the residents of Hermosillo, Sonora, in Northwest Mexico, to gain information about the use of herbal medicine, and its relationship with the sociodemographic characteristics of the population. Knowledge will be provided about the differences or similarities on the use of herbal medicine, to allow data comparisons among the different regions in the country and worldwide. Additionally, data associated with the practice of herbal medicine may help to elaborate regulations about the distribution and sale of herbal medicine in the country. This information will contribute to our understanding and analysis on the region's current use trends in herbal medicine, and to keep health professionals informed about this practice in Mexico.

MATERIAL AND METHODS

A cross-sectional study was conducted in the city of Hermosillo (29°04'30"N, 110°57'30"O), which has a population of 936,263 inhabitants (Ayuntamiento de Hermosillo, 2022). The study was carried out from May to September 2023. The inclusion criteria were adults of both sexes, aged over 18 years old, and residents of the municipality for at least two years. Furthermore, the Cochran formula was employed to calculate the minimum required sample size.

$$n = (z^2 * pq)/d^2$$

Where n = minimum sample size required in the study, z = Z score or standard deviations, p = proportion of people using herbal medicine in the study area and d = acceptable error level.

The estimated sample size was 384 subjects, calculated based on acceptable parameters with similar studies. These parameters include an acceptable error level of 3 % (0.03) and a 95 % confidence interval, corresponding to a Z score 1.96 (Aina *et al*., 2020). Subsequently, a structured and validated questionnaire with multiple-choice answers was applied to the participants based on Al Akeel *et al*. (2018) and culturally adapted (Al Akeel *et al*., 2018). Five questions for sociocultural data constituted the questionnaire, eight for socioeconomic information, and 11 for use and knowledge of herbal medicine. The responses were kept simple, objective, and concise to ensure optimal understanding by the participants.

Moreover, the socioeconomic level was determined using the AMAI rule 8 X 7, 2020, which has a scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). This classification was processed considering various factors, such as educational levels, occupation, possession of assets, and home dimensions. The distribution of questionnaires was conducted electronically through popular social media platforms such as X® (previously known as Twitter), Facebook®, and WhatsApp®. Google Forms® was employed for data collection, ensuring the participants' anonymity during the information-sharing process.

Descriptive statistics were used to interpret the data, and a chi-square test was carried out on the questions that did not allow more than one answer at a time, to find associations between the sociodemographic characteristics of the participants and their answers. All the statistical analyses were performed with the NCSS 2021 statistical package.

RESULTS AND DISCUSSION

Sociodemographic characteristics of the participants

The survey was conducted between July and September 2023, encompassing public spaces and academic institutions. A total of 441 individual agreed to participate. Regarding the demographic characteristics of the participants (Table 1), the majority were female (67.57 %), most participants were 30 years old or younger (67.57 %) and resided at urban areas (90.70 %). Regarding education, 51.94 % had completed university studies or attained a higher level of education, while the remainder had educational levels below this threshold. Additionally, the majority were employees (40.81 %) or students (34.92 %); therefore, they had a socioeconomic level of C.

Use and knowledge of herbal medicine

Regarding the responses provided by the survey participants (Table 2), 84.12 % affirm their awareness of, and experience with, herbal medicine. Notably, the primary source of knowledge about these alternatives is family, as 73.92 % of the participants reported. This is in agreement with previous findings indicating that even Mexican American residents continue to rely on traditional medicine within their family

Table 1. Sociodemographic data from the 441 participants of Hermosillo City (Northwest Mexico) from May to September 2023.
Tabla 1. Datos sociodemográficos de un total de 441 participantes de la ciudad de Hermosillo (noroeste de México) de mayo a septiembre de 2023.

Variables		n (%)
Sex	Female	298 (67.57)
	Male	143 (32.43)
Age (years)	≤30	298 (67.57)
	31-40	65 (14.73)
	≥40	78 (17.70)
Resident	Urban	400 (90.7)
	Rural	41 (9.3)
Education	Low level education	45 (10.20)
	High school	167 (37.86)
	University	190 (43.08)
	Postgraduate	30 (6.80)
	Other	9 (2.06)
Occupation	Unemployed	37 (8.39)
	Employed	180 (40.81)
	Health professional	18 (4.08)
	Administrative	15 (3.40)
	Student	154 (34.92)
	Other	37 (8.4)
†Socioeconomic level	A/B	34 (7.72)
	C+	111 (25.22)
	C	131 (29.77)
	C-	99 (22.5)
	D+	46 (10.45)
	D	19 (4.31)
	E	0 (0.0)

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E).

networks (Lopez, 2005). Similarly, González-Stuart (2010) reported that from interviews with herbal medicine vendors in Monterrey, 42 % indicated that their understanding of this alternative medicine stemmed from family traditions or personal experiences. This suggested a persistent cultural connection to herbal medicine within Mexican families, displaying limited variation in the Northern region.

On the other hand, the country's southern region has also highlighted the family's significant influence on adopting these medicinal alternatives, mainly attributed to mothers (Cabada-Aguirre *et al*., 2023). This underscores the notion that Mexican communities predominantly preserve this cultural practice. Furthermore, reports from the La Rosita community at Puerto Colombia reveal that like Mexico, mothers take a lead role in traditional medicine usage, followed by grandmothers (Duque *et al*., 2018). However, this pattern may differ from experiences in other countries worldwide. For instance, a study conducted in Saudi Arabia indicated that most participants who used herbal remedies, did so based on recommendations from friends and neighbors (Al Akeel *et al*., 2018), highlighting behaviors that may not necessarily be replicated in other regions.

Furthermore, 93.65 % of the participants indicated they exclusively resort to this medicine when necessary. Of these, 57.59 % reported partial success with the treatment, while 36.96 % deemed it entirely successful. Only 5.44 % reported undesirable effects or inadequate relief from discomfort. Herbal medicine has demonstrated historical efficacy in treating and alleviating conditions such as allergies, arthritis, migraines, burns, and gastrointestinal discomfort. However, the effectiveness of herbal medicine can be influenced by the product's origin, and although currently national institutions such as CANIFARMA, COFEPRIS, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos A.C., and the Federacion Nacional de la Industria Herbolaria, Medicina Alternativa, Tradicional y Naturista A.C., rules the herbal medicine, additional work is required to ensure the optimal distribution conditions and, to optimize their potential benefits (Guerrero-Encinas *et al*., 2023; Sam, 2019).

In addition, most respondents stated that they consumed unmixed, processed, or natural herbs or plants (50.02 %) and natural herbs or plants, while 35.82 % opted for commercial herbal products.

Additionally, a significant portion of participants (48.07 %) attributed their consumption of herbal remedies to family-inherited beliefs, and 36.50 % expressed a belief in the efficacy of these remedies. Presently, one of the primary motivations for using herbs in treating ailments is their natural origin and longstanding historical use by our ancestors. This inclination is reinforced by the perception that conventional medicine can occasionally lead to adverse effects on health (Elechi-Amadi *et al*., 2021). The industry has capitalized on this preference by investing in developing herbal medicine for commercial purposes. Reports indicate a substantial rise in the commercialization of herbal products for medicinal use, growing at a rate of 15 % annually, as per information from the World Bank (Gunjan *et al*., 2015). This information suggests that the commercialization of these products is emerging as a focal point for private initiatives fueled by a rising demand among the population.

On the other hand, 20.63 % of participants stated that they continue the use of herbal remedies even while undergoing conventional medical treatments, and 30.15 % suspend them occasionally. Furthermore, 41.59 % expressed a lack of belief in the safety of herbal medicine. In comparison, 27.66 % claimed uncertainty about its safety. Interestingly, despite the majority having reservations about the safety of herbal treatments, they tend to consume them concurrently with traditional medications. It is crucial to acknowledge that the combined effects of herbal medicine and allopathic medications may lead to antagonistic or, in some cases, synergistic effects that may not always be favorable. This concern is underscored by a study conducted on diabetic patients at the Jazan region of Saudi Arabia, where 33.7 % of participants reported the use of complementary and alternative medicine alongside modern medicine. Alarmingly, 67.4 % did not discuss their use of traditional remedies with their doctors, raising the possibility of either diminishing the

Table 2. Survey of use and knowledge of herbal medicine in 441 de participants of Hermosillo City (Northwest Mexico) from May to September 2023.
Tabla 2. Encuesta de uso y conocimiento de la medicina herbaria en 441 participantes de la ciudad de Hermosillo (noroeste de México) de mayo a septiembre de 2023.

Question and answer	n (%)	Question and answer	n (%)
1. Do you know about medicine-herbal remedies (use of plants, teas, tinctures, herbal extracts, essential oils, dietary supplements, creams, ointments), to treat or prevent ailments or diseases?		7. Why do you use herbal remedies as medicine?	
Yes	371 (84.12)	I think they are effective	161 (36.50)
No	70 (15.88)	I'm not sure	59 (13.37)
2. Have you used herbal medicine-remedies?		Beliefs (have been transmitted by family-friends)	212 (48.07)
Yes	370 (83.90)	Economy	9 (2.04)
No	71 (16.10)	8. When you take herbal remedies as medicine, do you avoid buying or taking conventional medications?	
3. How have you known about medicine-herbal remedies? (you can choose more than one answer)		Yes	91 (20.63)
TV	72 (16.32)	No	217 (49.20)
Internet	187 (42.40)	Occasionally	133 (30.15)
Friends	155 (35.14)	9. Do you think herbal remedies as medicine are safer than conventional medicine?	
Family	326 (73.92)	Yes	61 (13.83)
Health professionals	75 (17)	No	183 (41.59)
Other	49 (11.11)	I don't know	122 (27.66)
		It does not matter to me	75 (17.00)
4. How often do you use them?		10. Do you think that the information about herbal remedies used as medicine and published on commercial channels such as TV, radio, internet, social networks, can be reliable?	
Diary	19 (4.30)	Yes	132 (29.93)
Weekly	9 (2.04)	No	183 (41.49)
Only when necessary	413 (93.65)	It does not matter to me	126 (28.57)
5. How good was it to use the herbal remedy as medicine?		11. Have you used herbal remedies as medicine to treat your children?	
Successful	163 (36.96)	I don't have kids	291 (65.98)
Partially successful	254 (57.59)	I have never given them to them	49 (11.11)
Failed (Caused discomfort-did not relieve discomfort)	24 (5.44)	I have given them to them once	37 (8.39)
6. What type of herbal remedies have you used as medicine? (you can choose more than one answer)		I have given them to them more than once	64 (14.51)
Unmixed, processed, or natural herbs or plants	225 (50.02)		
Blend of known raw or natural herbs	145 (32.87)		
Unprocessed or natural unknown herb mix	16 (3.62)		
Commercial herbal products	158 (35.82)		
All the above	69 (15.64)		

intended effect, leading to hyperglycemia, or intensifying the effect, resulting in hypoglycemia (Meraya *et al*., 2022).

Furthermore, it has been evident that in Africa, a significant proportion of individuals, ranging from 12.4 to 77.1 %, concurrently consume both traditional and conventional medicine. Sometimes, healthcare providers may need to be aware of this dual consumption (Ekpor *et al*., 2023). Despite the benefits of phytotherapy, it is crucial to raise awareness among the population to encourage responsible use of these resources and prevent potential adverse effects, resulting from the current lack of comprehensive information about these treatments.

On the other hand, 41.49 % of respondents believe that the media's promotion of herbal medicine is unreliable, while 29.93 % express trust in it, and 28.57 % remain indifferent. Presently, there is a shift in public preferences, with doubts arising about the safety of conventional medicine. Consequently, individuals opt for herbal medicine due to its natural composition without synthetic chemical compounds. Exploiting these emerging opportunities, the industry markets products centered around plant extracts (Khayru and Issalillah, 2021). Nevertheless, regulations are imperative in overseeing the claims made by companies regarding these products. Many companies promise to alleviate a myriad of discomforts without substantial evidence, and these products often lack evaluations to substantiate the safety of their consumption (Ismail *et al*., 2018).

Finally, 65.98 % of the participants did not have children, but 22.90 % said they had given herbal treatment to their children once or more. A review carried out in the Latino population (from 1994 to 2013) indicated that most mothers perceive herbs as safe because they are natural, reporting their use to treat stomach pains, skin abrasions and dermatitis, constipation, and colic (Acorda *et al*., 2020). Additionally, a systematic review carried out in 2017, reported that over 66 % of children and adolescents who went to the doctor for gastrointestinal discomfort used complementary medicine, which included herbal medicine, and the parents surveyed thought that complementary medicine should also be considered by health professionals (Anheyer *et al*., 2017). The survey outcomes reveal a notable awareness and application of herbal medicine among participants, predominantly influenced by familial knowledge. This cultural connection to herbal remedies is consistent across diverse Mexican regions, highlighting the enduring impact of family traditions on healthcare decisions. Participants generally turn to herbal medicine when they perceive a need, reporting varying degrees of treatment success, with a small percentage noting undesirable effects. The choice among natural, processed, or commercial herbal products varies, reflecting a combination of family-inherited beliefs and general trust in the efficacy of these remedies. Concerns about the safety of herbal medicine, mainly when used alongside conventional treatments, emphasize the importance of heightened awareness and responsible use.

Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine

Regarding the data collected, an association was observed between knowing herbal medicine and being a woman (Table 3). The connection between women and their knowledge of herbal medicine ($p = 0.0096$) does not originate exclusively in a specific cultural context; somewhat, it is shaped by several factors that exhibit variations depending on the region and community under consideration. In specific cultural contexts, women have historically been assigned traditional roles focused on health care and household management. Within this framework, these women possess deep-rooted knowledge and practice using herbal remedies as an essential part of healthcare within the domestic setting (Boerma, 1995). On the other hand, some women may turn to herbal medicine to address specific health concerns, such as menstrual disorders and menopause, or even as a complement to prenatal and postnatal care (Magtalas *et al*., 2023).

On the other hand, an association was also found between being an urban resident and having used herbal medicine ($p = 0.0043$). In this context, this data is contradictory since rural communities, characterized by their close interaction with natural environments, frequently have direct access to various medicinal plants. This proximity to nature eases the acquisition of knowledge and the collection of herbs for medicinal purposes (Cordero *et al*., 2020). Likewise, herbal medicine has been transmitted from generation to generation in many rural communities as part of their cultural tradition. People learn about the use of medicinal plants through observation and oral teaching contributing to the continuity of these practices (Ouma, 2022). Nevertheless, increasing knowledge about the relevance of natural health has resulted in increased integration of herbal medicine into urban settings. Furthermore, the marketing of natural products and herbalists by urban commercial establishments is increasing, and this may explain this association. In addition, inadvertently herbal resources can be consumed, since are widely employed across some domains, including food, agriculture, and chemistry. These natural raw materials are used to create healthy food products, enhance soil quality in organic farming, and develop chemical compounds for various industrial and pharmaceutical applications (Bolouri *et al*., 2022).

In addition, there is an association among using herbal medicine occasionally and being an urban resident ($p = 0.0415$) with a university level of education ($p = 0.0001$), and affirms that the results of this use were partially successful (Table 4). The association among the occasional use of herbal medicine, urban residence, and college education raises interesting considerations. The evaluation of the partial success of these treatments highlights the complexity of measuring health outcomes and the need for additional research to understand the determinants of this relationship.

Likewise, an association was found between using herbal medicine occasionally, being an urban resident, and a university level of education, and the affirmation that the results of its use were partially successful ($p = 0.0262$) (Table 4). The association between the occasional use of herbal medicine, urban residence, and college education raises exciting considerations. The evaluation of the partial success of these treatments highlights the complexity of measuring health outcomes and the need for additional research to understand the determinants of this relationship.

Another interesting fact was observing an association between having a university education level and using herbal medicine based on "beliefs" ($p = 0.0011$) (Table 5). Although a college education can offer access to scientific and technological information, cultural and family connections often still play a significant role in health choices. The intergenerational transmission of knowledge about herbal remedies can influence the health practices of people with university training, showing the persistence of family traditions in medicine (Nworu *et al*., 2015).

Besides, an association was found between respondents who did not believe in media propaganda regarding herbal medicine and respondents under 30 years of age ($p = 0.0256$), who had university studies ($p = 0.0008$), and were still students ($p = 0.0016$) (Table 6). Younger, more educated individuals are often more critical and exposed to various information sources. University training can foster essential evaluation skills, leading to greater distrust in advertising messages. Additionally, the preference for more natural approaches in healthcare may influence the perception of

Table 3. Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine question 1-2 in 441 participants.
Tabla 3. Relación entre características sociodemográficas y uso y conocimiento de la medicina herbolaria pregunta 1-2 en 441 participantes.

Variables	Q1			Q2		
	Yes	No	P	Yes	No	P
Sex						
Female	260 (58.96%)	38 (8.62%)	0.0096*	253 (57.37%)	45 (10.20%)	0.4099
Male	111 (25.17%)	32 (7.26%)		117 (26.53%)	26 (5.90%)	
Total	371 (84.13%)	70 (15.87%)		370 (83.90%)	71 (16.10%)	
Age						
≤30	251 (56.92%)	47 (10.66%)	0.9750	250 (56.69%)	48 (10.88%)	0.2877
31-40	55 (12.47%)	10 (2.27%)		58 (13.15%)	7 (1.59%)	
≥41	65 (14.74%)	13 (2.95%)		62 (14.06%)	16 (3.63%)	
Total	371 (84.13%)	70 (15.87%)		370 (83.90%)	71 (16.10%)	
Environment						
Rural	33 (7.48%)	8 (1.81%)	0.5031	28 (6.35%)	13 (2.95%)	**0.0043***
Urban	338 (76.64%)	62 (14.06%)		342 (77.55%)	58 (13.15%)	
Total	371 (84.13%)	70 (15.87%)		370 (83.90%)	71 (16.10%)	
Educational level						
Elementary	5 (1.13%)	0 (0.00%)	0.1129	5 (1.13%)	0 (0.00)	0.0252*
Middle School	36 (7.16%)	4 (0.91%)		38 (8.62%)	2 (0.45%)	
High School	132 (29.93%)	35 (7.94%)		129 (28.25%)	38 (8.62%)	
Bachelor´s Degree	166 (37.64%)	24 (5.44%)		163 (36.96%)	27 (6.12%)	
Postgraduate Degree	26 (5.90%)	4 (0.91%)		28 (6.35%)	2 (0.45%)	
Other	6 (1.36%)	3 (0.68%)		7 (1.59%)	2 (0.45%)	
Total	371 (84.13%)	70 (16.87%)		370 (83.90%)	71(16.10%)	
Occupation						
Unemployed	32 (7.26%)	5 (1.13%)	0.1976	34 (7.71%)	3 (0.68%)	0.6878
Employee	149 (33.79%)	31 (7.03%)		147 (33.33%)	33 (7.48%)	
Health professional	18 (4.08%)	0 (0.00%)		16 (3.63%)	2 (0.45%)	
Administrative	10 (2.27%)	5 (1.13%)		13 (2.95%)	2 (0.45%)	
Student	131 (29.71%)	23 (5.22%)		130 (29.48%)	24 (5.44%)	
Other	31 (7.03%)	6 (1.36%)		30 (6.80%)	7 (1.59%)	
Total	371 (84.13%)	70 (15.87%)		370 (83.90%)	71 (16.10%)	
†**Socioeconomic level**			0.2172			0.6015
A/B	28 (6.35%)	6 (1.36%)		32 (7.26%)	2 (0.45%)	
C+	96 (21.77%)	15 (3.40%)		90 (20.41%)	21 (4.76%)	
C	103 (23.36%)	28 (6.35%)		109 (24.72%)	22 (4.99%)	
C-	83 (18.82%)	16 (3.63%)		84 (19.05%)	15 (3.40%)	
D+	43 (9.75%)	3 (0.68%)		39 (8.84%)	7 (1.59%)	
D	18 (4.08%)	2 (0.45%)		16 (3.63%)	4 (0.91%)	
E	0 (0.00%)	0 (0.00%)		0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Total	371 (84.13%)	70 (0.68%)		370	71	

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). Q1; question 1, Q2; question 2. 2-sided Chi-square test, *Significant ($p < 0.05$).

herbal medicine, especially among those still immersed in academic settings. Even so, the influence of mass media on the use of herbal medicine is undeniable. Through various platforms such as television, internet, and social media, information is spread widely, shaping public perceptions and behaviors (Ng *et al*., 2023). Media coverage often highlights the perceived benefits of herbal medicine, leading to increased interest and adoption among consumers seeking alternative or complementary healthcare options.

Finally, it is worth to note the no association between the socioeconomic level and herbal medicine use and knowledge. Currently, herbal medicine is not conditioned by socioeconomic strata, evidencing a trend toward democratizing this practice in various communities. Unlike in the past, where specific natural health approaches might have been tied to certain economic levels, today, a broader and more diverse acceptance of herbal medicine is seen across all sectors of society (Kemppainen *et al*., 2018). On the another

Table 4. Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine question 4-5 by 441 participants.
Tabla 4. Relación entre características sociodemográficas y uso y conocimiento de la medicina herbolaria pregunta 4-5 en 441 participantes.

Variable	Q4				Q5			
	Diary	Weekly	Occasionally	P	Successful	Partially successful	Fail	P
Sex								
Female	17 (3.85%)	5 (1.13%)	276 (62.59%)		107 (24.26%)	175 (39.68%)	16 (3.63%)	
Male	2 (0.45%)	4 (0.91%)	137 (31.07%)	0.0882	56 (12.70%)	79 (32.43%)	8 (1.81%)	0.7830
Total	19 (4.31%)	9 (2.04%)	413 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	
Age								
≤30	13 (2.95%)	3 (0.68%)	282 (63.95%)		107 (24.26%)	174 (39.46%)	17 (3.85%)	
31-40	1 (0.23%)	3 (0.68%)	61 (13.83%)	0.1340	25 (5.67%)	35 (7.94%)	5 (1.13%)	0.6783
≥41	5 (1.13%)	3 (0.68%)	70 (15.87%)		31 (7.03%)	45 (10.20%)	2 (0.45%)	
Total	19 (4.31%)	9 (2.04%)	413 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	
Environment								
Rural	2 (0.45%)	3 (0.68%)	36 (8.16%)		14 (3.17%)	26 (5.90%)	1 (0.23%)	
Urban	17 (3.85%)	6 (1.36%)	377 (85.49%)	**0.0415***	149 (33.79%)	228 (51.70)	23 (5.22%)	0.5736
Total	19 (4.31%)	9 (2.04%)	413 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	
Educational level								
Elementary	1 (0.23%)	1 (0.23%)	3 (0.68%)		2 (0.45%)	3 (0.68%)	0 (0.00%)	
Middle School	5 (1.13%)	0 (0.00%)	35 (7.94%)		25 (5.67%)	13 (2.95%)	2 (0.45%)	
High School	2 (0.45%)	4 (0.91%)	161 (36.51%)	**0.0001***	59 (13.38%)	99 (22.45%)	9 (2.04%)	
Bachelor	8 (1.81%)	1 (0.23%)	181 (41.04%)		57 (12.93%)	122 (27.66%)	11 (2.49%)	**0.0262***
Postgraduate	2 (0.45%)	3 (0.68%)	25 (5.67%)		16 (3.63%)	13 (2.95%)	1 (0.23%)	
Other	1 (0.23%)	0 (0.00%)	8 (1.81%)		4 (0.91%)	4 (0.91%)	1 (0.23%)	
Total	19 (4.31%)	9 (2.04%)	431 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	
Occupation								
Unemployed	1 (0.23%)	2 (0.45%)	34 (7.71%)		16 (3.63%)	17 (3.85%)	4 (0.91%)	
Employee	8 (1.81%)	5 (1.13%)	167 (37.87%)		67 (15.19%)	104 (23.58%)	9 (2.04%)	
Health professional	2 (0.45%)	0 (0.00%)	16 (3.63%)		7 (1.59%)	11 (2.49%)	0 (0.00%)	
Administrative	0 (0.00%)	0 (0.00%)	15 (3.40%)	0.0755	2 (0.45%)	12 (2.72%)	1 (0.23%)	0.1985
Student	3 (0.68%)	2 (0.45%)	149 (33.79%)		52 (11.79%)	95 (21.54%)	7 (1.59%)	
Other	5 (1.13%)	0 (0.00%)	32 (7.26%)		19 (4.31%)	15 (3.40%)	3 (0.68%)	
Total	19 (4.31%)	9 (2.04%)	413 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	
†**Socioeconomic level**								
A/B	2 (0.45%)	0 (0.00%)	32 (7.26%)		12 (2.72%)	22 (4.99%)	0 (0.00%)	
C+	5 (1.13%)	4 (0.91%)	102 (23.13%)		45 (10.20%)	59 (13.38%)	7 (1.59%)	
C	6 (1.36%)	4 (0.91%)	121 (27.44%)		41 (9.30%)	85 (19.27%)	5 (1.13%)	
C-	3 (0.68%)	0 (0.00%)	96 (21.77%)	0.5640	42 (9.52%)	52 (11.79%)	5 (1.13%)	0.0936
D+	3 (0.68%)	0 (0.00%)	43 (9.75%)		19 (4.31%)	21 (4.76%)	6 (1.36%)	
D	0 (0.00%)	1 (0.23%)	19 (4.31%)		4 (0.91%)	15 (3.40%)	1 (0.13%)	
E	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)		0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Total	19 (4.31%)	9 (2.045)	413 (93.65%)		163 (36.96%)	254 (57.60%)	24 (5.44%)	

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). Q4; question 4, Q5; question 5. 2-sided Chi-square test, *Significant ($p < 0.05$).

hand, although wealthy people have access to high-priced products that promise to be more effective, current government institutions have not been able to fully regulate the process of these products, increasing the risk of accessing to unexpected less effective items (Balekundri and Mannur, 2020). People from different socioeconomic backgrounds are turning to herbal medicine to address various health needs, reflecting a shift toward a more accessible appreciation of natural care methods. This phenomenon suggests that herbal medicine has surpassed economic barriers and has become a treatment option appreciated for its accessibility and comprehensive approach to well-being. On another hand, most of participants reported that they did not have children, observing an association between this and being a student, and/or having high school as level of education (Table 7). For this reason, no association was found between sociodemographic characteristics and administering herbal medicine to their children.

In herbal medicine, it is strongly recommended to consult a healthcare professional before starting its administration. Thorough research on herbs, their proper dosage, and possible interactions, are essential for safe application. Informing health professionals about herbal medicine usage, purchasing quality products, and being aware of potential adverse reactions are crucial practices. Furthermore, it is emphasized that herbal medicine should not replace conventional medical treatments, and that variety in the diet, including herbs and medicinal foods, can be a balanced way to take advantage of its benefits. These recommendations are significant for vulnerable groups such as pregnant women, older people, and those with preexisting medical conditions.

Table 5. Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine question 7-8 by 441 participants.
Tabla 5. Relación entre características sociodemográficas y uso y conocimiento de la medicina herbolaria pregunta 7-8 en 441 participantes.

Variable	Q7					Q8			
	Effective	Beliefs	Economic	Not sure	P	Yes	No	Occasionally	P
Sex									
Female	110 (24.94%)	147 (33.33%)	4 (0.91%)	37 (8.39%)		60 (13.61%)	145 (32.88%)	93 (21.09%)	
Male	51 (11.56%)	65 (14.74%)	5 (1.13%)	22 (4.99%)	0.3652	31 (7.03%)	72 (16.33%)	40 (9.07%)	0.7775
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	
Age									
≤30	104 (23.58%)	146 (33.11%)	3 (0.68%)	45 (10.20%)		61 (13.83%)	154 (34.92%)	83 (18.82%)	
31-40	23 (5.22%)	33 (7.48%)	3 (0.68%)	6 (1.36%)	0.1748	11 (2.49%)	30 (6.80%)	24 (5.44%)	0.4084
≥41	34 (7.71%)	33 (7.48%)	3 (0.68%)	8 (1.81%)		19 (4.31%)	33 (7.48%)	26 (5.90%)	
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	
Environment									
Rural	15 (3.40%)	16 (3.63%)	3 (0.68%)	7 (1.59%)		11 (2.49%)	17 (3.85%)	13 (2.95%)	
Urban	146 (33.11%)	196 (44.44%)	6 (1.36%)	52 (11.79%)	0.0603	80 (18.14%)	200 (45.35%)	120 (27.21%)	0.4899
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	
Educational level									
Elementary	2 (0.45%)	3 (0.68%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)		2 (0.45%)	3 (0.68%)	0 (0.00%)	
Middle School	28 (6.35%)	10 (2.27%)	0 (0.00%)	2 (0.45%)		13 (2.95%)	17 (3.85%)	10 (2.27%)	
High School	52 (11.79%)	12 (17.91%)	4 (0.91%)	32 (7.26%)		37 (8.39%)	73 (16.55%)	57 (12.93%)	
Bachelor	63 (14.29%)	103 (23.36%)	5 (1.13%)	19 (4.31%)	**0.0011***	31 (7.03%)	104 (23.58%)	55 (12.47%)	0.2266
Postgraduate	15 (3.40%)	12 (2.72%)	0 (0.00%)	3 (0.68%)		6 (1.36%)	17 (3.85%)	7 (1.59%)	
Other	1 (0.23%)	5 (1.13%)	0 (0.00%)	3 (0.68%)		2 (0.45%)	3 (0.68%)	4 (0.91%)	
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	
Occupation									
Unemployed	18 (4.08%)	16 (3.36%)	0 (0.00%)	3 (0.68%)		8 (1.81%)	20 (4.54%)	9 (2.04%)	
Employee	68 (15.42%)	88 (19.95%)	3 (0.68%)	21 (4.76%)		35 (7.94%)	86 (19.50%)	59 (13.38%)	
HP	7 (1.59%)	10 (2.27%)	0 (0.00%)	1 (0.23%)		5 (1.13%)	11 (2.49%)	2 (0.45%)	
Administrative	6 (1.36%)	5 (1.13%)	1 (0.23%)	3 (0.68%)	0.5370	5 (1.13%)	7 (1.59%)	3 (0.68%)	0.7475
Student	46 (10.43%)	80 (18.14%)	4 (0.91%)	24 (5.44%)		29 (6.58%)	76 (17.23%)	49 (11.11%)	
Other	16 (3.36%)	13 (2.95%)	1 (0.23%)	7 (1.59%)		9 (2.04%)	17 (3.85%)	11 (2.49%)	
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	
†**Socioeconomic level**									
A/B	11 (2.49%)	20 (4.54%)	1 (0.23%)	2 (0.45%)		11 (2.49%)	15 (3.40%)	8 (1.81%)	
C+	33 (7.48%)	58 (13.15%)	2 (0.45%)	18 (4.08%)		21 (4.76%)	54 (12.24%)	36 (8.16%)	
C	54 (12.24%)	56 (12.70%)	3 (0.68%)	18 (4.08%)		27 (6.12%)	62 (14.06%)	42 (9.52%)	
C-	38 (8.62%)	48 (10.88)	3 (0.68%)	10 (2.27%)	0.6860	23 (5.22%)	53 (12.02%)	23 (5.22%)	0.3868
D+	15 (3.40%)	23 (5.22%)	0 (0.00%)	8 (1.81%)		4 (0.91%)	25 (5.67%)	17 (3.85%)	
D	10 (2.27%)	7 (1.59%)	0 (0.00%)	3 (0.68%)		5 (1.13%)	8 (1.81%)	7 (1.59%)	
E	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)		0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Total	161 (36.51%)	212 (48.07%)	9 (2.04%)	59 (13.38%)		91 (20.63%)	217 (49.21%)	133 (30.16%)	

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). Q7; question 7, Q8; question 8. 2-sided Chi-square test, *Significant ($p < 0.05$).

Table 6. Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine question 9-10 by 441 participants.
Tabla 6. Relación entre características sociodemográficas y uso y conocimiento de la medicina herbolaria pregunta 9-10 en 441 participantes.

Variable	Q9					Q10			
	Yes	No	I don't know	Indifferent	P	Yes	No	Indifferent	P
Sex									
Female	41 (9.30%)	131 (29.71%)	74 (16.78%)	52 (11.79%)		82 (18.59%)	130 (29.48%)	86 (19.50%)	
Male	20 (4.54%)	52 (11.79%)	48 (10.88%)	23 (5.22%)	0.2490	52 (11.34%)	53 (12.02%)	40 (9.07%)	0.2441
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	
Age									
≤30	36 (8.16%)	133 (30.16%)	76 (17.23%)	53 (12.02%)		75 (17.01%)	132 (29.93%)	91 (20.63%)	
31-40	8 (1.81%)	28 (6.35%)	20 (4.54%)	9 (2.04%)	0.1037	23 (5.22%)	25 (5.67%)	17 (3.85%)	**0.0256***
≥41	17 (3.85%)	22 (4.99%)	26 (5.90%)	13 (2.95%)		34 (7.71%)	26 (5.90%)	18 (4.08%)	
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	
Environment									
Rural	9 (2.04%)	9 (2.04%)	17 (3.85%)	6 (1.35%)		20 (9.30%)	9 (2.04%)	12 (2.72%)	
Urban	52 (11.79%)	174 (39.46%)	105 (23.81%)	69 (15.65%)	**0.0225***	112 (25.40%)	174 (39.46%)	114 (25.85%)	**0.0085***
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	
Educational level									
Elementary	2 (0.45%)	0 (0.00%)	3 (0.68%)	0 (0.00%)		4 (0.91%)	1 (0.23%)	0 (0.00%)	
Middle School	11 (2.49%)	5 (3.40%)	9 (2.04%)	5 (1.13%)		21 (4.76%)	12 (2.72%)	7 (1.59%)	
High School	19 (4.31%)	66 (14.97%)	52 (11.79%)	30 (6.80%)		43 (9.75%)	67 (15.19%)	57 (12.93%)	
Bachelor	25 (5.67%)	85 (19.27%)	49 (11.11%)	31 (7.03%)	0.2218	48 (10.88%)	85 (19.27%)	57 (12.93%)	**0.0008***
Postgraduate	3 (0.68%)	14 (3.17%)	7 (1.59%)	6 (1.36%)		10 (2.27%)	16 (3.63%)	4 (0.91%)	
Other	1 (0.23%)	3 (0.68%)	2 (0.45%)	3 (0.68%)		6 (1.36%)	2 (0.45%)	1 (0.23%)	
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	
Occupation									
Unemployed	4 (0.91%)	17 (3.85%)	12 (2.72%)	4 (0.91%)		16 (3.63%)	15 (3.40%)	6 (1.36%)	
Employee	27 (6.12%)	64 (14.51%)	54 (12.24%)	35 (7.94%)		59 (13.38%)	71 (16.10%)	50 (11.34%)	
Health professional	2 (0.45%)	9 (2.04%)	3 (0.68%)	4 (0.91%)		2 (0.45%)	9 (2.04%)	7 (1.59%)	
Administrative	1 (0.23%)	5 (1.13%)	6 (1.36%)	3 (0.68%)	0.5700	6 (1.36%)	6 (1.36%)	3 (0.68%)	**0.0016***
Student	19 (4.31%)	73 (16.55%)	36 (8.16%)	26 (5.90%)		29 (6.58%)	72 (16.33%)	53 (12.02%)	
Other	8 (1.81%)	15 (3.40%)	11 (2.49%)	3 (0.68%)		20 (4.54%)	10 (2.27%)	7 (1.59%)	
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	
†**Socioeconomic level**									
A/B	5 (1.13%)	15 (3.40%)	6 (1.36%)	8 (1.81%)		9 (2.04%)	16 (3.63%)	9 (2.04%)	
C+	15 (3.40%)	44 (9.98%)	38 (8.62%)	14 (3.17%)		30 (6.80%)	51 (11.56%)	30 (6.80%)	
C	16 (3.63%)	63 (14.29%)	34 (7.71%)	18 (4.08%)		40 (9.07%)	53 (12.02%)	38 (8.62%)	
C-	18 (4.08%)	38 (8.62%)	24 (5.44%)	19 (4.31%)	0.2325	33 (7.48%)	34 (7.71%)	32 (7.26%)	0.9296
D+	3 (0.68%)	14 (3.17%)	16 (3.36%)	13 (2.95%)		13 (2.95%)	20 (4.54%)	13 (2.95%)	
D	4 (0.91%)	9 (2.04%)	4 (0.91%)	3 (0.68%)		7 (1.59%)	9 (2.04%)	4 (0.91%)	
E	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)		0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Total	61 (13.83%)	183 (41.50%)	122 (27.66%)	75 (17.01%)		132 (29.93%)	183 (41.50%)	126 (28.57%)	

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). Q9; question 9, Q10; question 10. 2-sided Chi-square test, *Significant ($p < 0.05$).

Table 7. Relationship between sociodemographic characteristics and use and knowledge of herbal medicine question 11 by 441 participants.
Tabla 7. Relación entre características sociodemográficas y uso y conocimiento de la medicina herbolaria pregunta 11 en 441 participantes.

Variable	Q11				
	Once	+Once	No	No children	P
Sex					
Female	29 (6.58%)	43 (9.47%)	36 (8.16%)	190 (43.08%)	
Male	8 (1.81%)	21 (4.76%)	13 (2.95%)	101 (22.90%)	0.3281
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	
Age					
≤30	23 (5.22%)	36 (8.16%)	36 (8.16%)	203 (46.03%)	
31-40	5 (1.13%)	10 (2.27%)	10 (2.27%)	40 (9.07%)	0.0626
≥41	9 (2.04%)	18 (4.08%)	3 (0.68%)	48 (10.88%)	
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	
Environment					
Rural	0 (0.00%)	7 (1.59%)	5 (1.13%)	29 (6.58%)	
Urban	37 (8.39%)	57 (12.93%)	44 (9.98%)	262 (59.41%)	0.2408
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	
Educational level					
Elementary	1 (0.23%)	3 (0.68%)	0 (0.00%)	1 (0.23%)	
Middle School	9 (2.04%)	13 (2.95%)	4 (0.91%)	14 (3.17%)	
High School	7 (1.59%)	21 (4.76%)	19 (4.31%)	120 (27.21%)	
Bachelor	18 (4.08%)	18 (4.08%)	18 (4.08%)	136 (30.84%)	**0.0000***
Postgraduate	1 (0.23%)	6 (1.36%)	7 (1.59%)	16 (3.63%)	
Other	1 (0.23%)	3 (0.68%)	1 (0.23%)	4 (0.91%)	
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	
Occupation					
Unemployed	5 (1.13%)	10 (2.27%)	5 (1.13%)	17 (3.85%)	
Employee	19 (4.31%)	31 (7.03%)	22 (4.99%)	108 (24.49%)	
Health professional	4 (0.91%)	5 (1.13%)	3 (0.68%)	6 (1.36%)	
Administrative	1 (0.23%)	2 (0.45%)	1 (0.23%)	11 (2.49%)	**0.0000***
Student	1 (0.23%)	5 (1.13%)	7 (1.59%)	141 (31.97%)	
Other	7 (1.59%)	11 (2.49%)	11 (2.49%)	8 (1.81%)	
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	
†**Socioeconomic level**					
A/B	3 (0.68%)	8 (1.81%)	5 (1.13%)	18 (4.08%)	
C+	8 (1.18%)	16 (3.63%)	16 (3.63%)	71 (16.10%)	
C	10 (2.27%)	15 (3.40%)	16 (3.63%)	90 (20.41%)	
C-	9 (2.04%)	18 (4.08%)	8 (1.81%)	64 (14.51%)	0.1924
D+	2 (0.45%)	4 (0.91%)	3 (0.68%)	37 (8.39%)	
D	5 (1.13%)	3 (0.68%)	1 (0.23%)	11 (2.49%)	
E	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Total	37 (8.39%)	64 (14.51%)	49 (11.11%)	291 (65.99%)	

† Scale that categorizes Mexican households into different socioeconomic segments, ranging from level A/B, which indicates the highest socioeconomic stratum, to level E, which reflects the lowest socioeconomic stratum (A/B, C+, C, C-, D+, D, and E). Q11; question 11. 2-sided Chi-square test, *Significant ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS

Our findings reveal the persistence of intergenerational solid and cultural ties that significantly influence adopting herbal practice despite the educational level achieved. The widespread awareness and positive perception of herbal medicine underline its roots in the daily lives of Mexican families. Sociodemographic characteristics such as gender, urban residence, and education level, among others described above, are associated with the knowledge and usage of herbal medicine, highlighting the complex interplay among cultural, social, and educational factors in shaping health practices. This may reflect similarities between the Northwest region, specifically the city of Hermosillo, and what is reported in other areas. However, measures are still necessary to promote the safe use of these treatments. The need for clear and compelling regulations in this area is highlighted. Furthermore, the relevance of addressing these issues stands out from a local perspective, the culture and social particularities that shape the relationship between the population and herbal medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to the people who participated in the survey, to CONAHCyT for doctoral scholarships awarded to Ildefonso Guerrero Encinas and Javier N. González González.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Adams, J.D., Garcia, C., and Lien, E.J. 2010. A comparison of Chinese and American Indian (Chumash) medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 7, 219-225. https://doi.org/10.1093/ecam/nem188

Aina, O., Gautam, L., Simkhada, P., and Hall, S. 2020. Prevalence, determinants and knowledge about herbal medicine and non-hospital utilisation in southwest Nigeria: a cross-sectional study. BMJ Open 10, e040769. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-040769

Al Akeel, M., Al Ghamdi, W., Al Habib, S., Koshm, M., and Al Otaibi, F. 2018. Herbal medicines: Saudi population knowledge, attitude, and practice at a glance. Journal of Family Medicine and Primary Care 7, 865-875. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_315_17

Alonso-Castro, A.J., Ruiz-Padilla, A.J., Ruiz-Noa, Y., Alba-Betancourt, C., Domínguez, F., Ibarra-Reynoso, L.D.R., Maldonado-Miranda, J.J., Carranza-Álvarez, C., Blanco-Sandate, C., Ramírez-Morales, M.A., Zapata-Morales, J.R., Deveze-Álvarez, M.A., Mendoza-Macías, C.L., Solorio-Alvarado, C.R., and Rangel-Velázquez, J.E. 2018. Self-medication practice in pregnant women from central Mexico. Saudi Pharmaceutical Journal 26, 886-890. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.03.008

Anheyer, D., Frawley, J., Koch, A.K., Lauche, R., Langhorst, J., Dobos, G., and Cramer, H. 2017. Herbal medicines for gastrointestinal disorders in children and adolescents: a systematic review. Pediatrics 139, e20170062. https://doi.org/10.1542/peds.2017-0062

Armendáriz-Barragán, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodríguez, S.A., Kabbaj, D., Fessi, H., and Elaissari, A. 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. Expert Opinion on Drug Delivery 13, 1165-1175. https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487

Balekundri, A., Mannur, V. 2020. Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. Future Journal of Pharmaceutical Sciences 6, 67. https://doi.org/10.1186/s43094-020-00091-5

Boerma, T. 1995. The epidemiological transition: policy and planning implications for developing countries. [Workshop Proceedings]. Population Studies 49, 178-180. https://doi.org/10.1080/0032472031000148376

Bolouri, P., Salami, R., Kouhi, S., Kordi, M., Asgari Lajayer, B., Hadian, J., and Astatkie, T. 2022. Applications of essential oils and plant extracts in different industries. Molecules 27, 8999. https://doi.org/10.3390/molecules27248999

Cabada-Aguirre, P., López López, A.M., Mendoza, K.C.O., Garay Buenrostro, K.D., Luna-Vital, D.A., and Mahady, G.B. 2023. Mexican traditional medicines for women's reproductive health. Scientific Reports 13, 2807-2820. https://doi.org/10.1038/s41598-023-29921-1

Cordero, S., Gálvez, F., Arenas, J., and Rodríguez Valenzuela, E. 2020. Does access to natural environments explain differences in the use of wild plants between rural and urban populations? Botanical Sciences 99, 104-123. https://doi.org/10.17129/botsci.2622

Duque, M., Gómez, C.M., Cabrera, J.A., and Guzmán, J.D. 2018. Important medicinal plants from traditional ecological knowledge: the case La Rosita community of Puerto Colombia (Atlántico, Colombia). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 17, 324-341.

Ekpor, E., Osei, E., and Akyirem, S. 2023. Prevalence and predictors of traditional medicine use among persons with diabetes in Africa: a systematic review. International Health ihad080. https://doi.org/10.1093/inthealth/ihad080

Elechi-Amadi, K.N., Briggs, O.N., Konne, F.E., Giami, L.K., C. and Ajufo, B. 2021. Perception and acceptance of herbal medicines among residents of Port Harcourt, Nigeria. Journal of Complementary and Alternative Medical Research 12, 24-34. https://doi.org/10.9734/jocamr/2020/v12i330209

González-Stuart, A.E. 2010. Use of medicinal plants in Monterrey, Mexico. Notulae Scientia Biologicae 2, 07-11. https://doi.org/10.15835/nsb245399

Guerrero-Encinas, I., González-González, J.N., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., Ledesma-Osuna, A.I., López-Mata, M.A., Morales-Figueroa, G.G., and Quihui-Cota, L. 2023. Reviewing the potential of natural antimicrobials for *Salmonella* spp. gastrointestinal infections: *in vitro* and *in vivo* evaluations. Revista Brasileira de Farmacognosia. https://doi.org/10.1007/s43450-023-00481-9

Gunjan, M., Naing, T.W., Saini, R.S., Naidu, D.J.R., and Kumar, I. 2015. Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease. World Journal of Pharmaceutical Research 4, 132-155.

Hopkins, A., 2011. Use of network centrality measures to explain individual levels of herbal remedy cultural competence among the Yucatec Maya in Tabi, Mexico. Field Methods 23, 307-328. https://doi.org/10.1177/1525822X11399400

Ismail, S.F., Daud, M., Jalil, J.Abd., Azmi, I.M.A.G., and Safuan, S. 2018. Protecting consumers from misleading online advertisement for herbal and traditional medicines

in Malaysia: are the laws sufficient? 6th International Conference on Cyber and IT Service Management 1-6. https://doi.org/10.1109/CITSM.2018.8674372

Kemppainen, L.M., Kemppainen, T.T., Reippainen, J.A., Salmenniemi, S.T., and Vuolanto, P.H. 2018. Use of complementary and alternative medicine in Europe: health-related and sociodemographic determinants. Scandinavian Journal of Public Health 46, 448-455. https://doi.org/10.1177/1403494817733869

Khayru, R.K., and Issalillah, F. 2021. Study on consumer behavior and purchase of herbal medicine based on the marketing mix. Journal of Marketing and Business Research 1. 1-14.

Lopez, R.A. 2005. Use of alternative folk medicine by Mexican American women. Journal of Immigrant Health 7, 23-31. https://doi.org/10.1007/s10903-005-1387-8

Lucía, C.-P.A., Jacqueline, B.-R., Alberto, B.-R.L., David, B.-A., and Beatriz, R.-A. 2021. Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 17, 7. https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y

Magtalas, M.C., Balbin, P.T., Cruz, E.C., Adizas, A.V., Gerardo, J.P.Z., Sausa, R.B., Lee, K.Y., and Tantengco, O.A.G. 2023. A systematic review of medicinal plants used in the treatment of gynecologic diseases in the Philippines. Phytomedicine Plus 3, 100462. https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100462

Meraya, A.M., Ahsan, W., Albratty, M., Alhazmi, H.A., and Najmi, A. 2022. Perception of individuals with diabetes about efficacy and safety of complementary and alternative medicines (CAM) in the Jazan Region, Saudi Arabia. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2022, 1-8. https://doi.org/10.1155/2022/2104056

Ng, J.Y., Verhoeff, N., and Steen, J. 2023. What are the ways in which social media is used in the context of complementary and alternative medicine in the health and medical scholarly literature? a scoping review. BMC Complement Med Ther 23, 32. https://doi.org/10.1186/s12906-023-03856-6

Nworu, C.S., Udeogaranya, P.O., Okafor, C.K., Adikwu, A.O., and Akah, P.A. 2015. Perception, usage and knowledge of herbal medicines by students and academic staff of University of Nigeria: A survey. European Journal of Integrative Medicine 7, 218–227. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.01.005

Ouma, A. 2022. Intergenerational learning processes of traditional medicinal knowledge and socio-spatial transformation dynamics. Frontiers in Sociology 7, 661992. https://doi.org/10.3389/fsoc.2022.661992

Rodriguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S.W., Herrera-Ruiz, D., and Torres, E. 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. Toxicology and Applied Pharmacology 227, 125-135. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.10.005

Rojas, P., Jung-Cook, H., Ruiz-Sánchez, E., Rojas-Tomé, I.S., Rojas, C., López-Ramírez, A.M., and Reséndiz-Albor, A.A. 2022. Historical aspects of herbal use and comparison of current regulations of herbal products between Mexico, Canada and the United States of America. International Journal of Environmental Research and Public Health 19, 15690. https://doi.org/10.3390/ijerph192315690

Ruiz-Noa, Y., Ibarra-Reynoso, L.D.R., Ruiz-Padilla, A.J., Alonso-Castro, A.J., Ramírez-Morales, M.A., Zapata-Morales, J.R., Orozco-Castellanos, L.M., Solorio-Alvardo, C.R., and Lara-Morales, A. 2021. Use of herbal medicine for diabetes mellitus in adults from the central–western region of Mexico. Primary Care Diabetes 15, 1095-1099. https://doi.org/10.1016/j.pcd.2021.08.010

Sam, D.S. 2019. Importance and effectiveness of herbal medicines. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8, 354-357.

Veiga, M., Costa, E.M., Silva, S., and Pintado, M. 2018. Impact of plant extracts upon human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 60, 873-886 https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1540969

Welz, A.N., Emberger-Klein, A., and Menrad, K. 2019. The importance of herbal medicine use in the German healthcare system: prevalence, usage pattern, and influencing factors. BMC Health Serv Res 19, 952. https://doi.org/10.1186/s12913-019-4739-0

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Relación entre composición corporal y desempeño físico en triatletas aficionados de media distancia

Relationship between body composition and physical performance in amateur middle-distance triathletes

Ana María Manrique Lenis[1], Diego Camilo García-Chaves[1]*, Luisa Fernanda Corredor-Serrano[1], Shamyr Aly Forero[1], Santiago Adolfo Arboleda-Franco[2]

[1] Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte. Colombia.
[2] Universidad del Valle. Colombia.

RESUMEN

La composición corporal del triatleta puede influir en factores como la eficiencia energética, el umbral láctico y el consumo máximo de oxígeno, afectando el desempeño físico en la prueba; sin embargo, ese grado de relación no está suficientemente documentado. Objetivo: Determinar la relación entre composición corporal y desempeño físico en triatletas de media distancia de nivel aficionado. Metodología: se evaluaron 16 triatletas masculinos (edad 37,3 ± 4,9 años, peso 69,2 ± 13,8 kg, talla 170,7 ± 10,7cm) registrándose medidas antropométricas básicas, longitudes segmentales, pliegues y perímetros, y se determinó la composición corporal. El desempeño físico se evaluó mediante fuerza explosiva con la altura, la potencia en los saltos *Squat Jump* (SJ) y contramovimiento (CMJ) y específicamente con las pruebas: 400 m de natación, test de potencia funcional en ciclismo (FTP) y 3000 m de carrera a pie. Se hizo un análisis descriptivo y se correlacionaron entre sí todas las variables. Resultados: El ritmo por 100 m en natación tuvo correlaciones significativas con la envergadura (r = -0,511; p = 0,043), la longitud del antebrazo (r = -0,619; p = 0,010) y la masa muscular (r = -0,619; p = 0,010). Esta última, también correlacionó con un mejor ritmo por kilómetro en la carrera a pie (r = -0,534; p = 0,033). El FTP en ciclismo correlacionó con los saltos CMJ (r = 0,689; p = 0,003), SJ (r = 0,570; p = 0,021) y con el porcentaje de grasa (r = -0,711; p = 0,002). Conclusión: la relación entre composición corporal y rendimiento físico en los triatletas estudiados, se manifiesta diferenciadamente según cada prueba específica, revelando la importancia de la masa muscular en el ritmo de carrera en natación y a pie y la grasa en la potencia potencia funcional en ciclismo.

Palabras clave: Triatlón, rendimiento, fuerza explosiva, masa muscular.

ABSTRACT

The triathlete's body composition can influence factors such as energy efficiency, lactic threshold and maximum oxygen consumption, affecting physical performance in the test; however, this degree of relationship is not sufficiently documented. Objective: To determine the relationship between body composition and physical performance in amateur middle-distance triathletes. Methodology: 16 male triathletes (age 37.3 ± 4.9 years, weight 69.2 ± 13.8 kg, height 170.7 ± 10.7 cm) were evaluated, recording basic anthropometric measurements, segmental lengths, skinfolds and perimeters, and determining body composition. Physical performance was assessed by explosive strength with height, power in the squat jump (SJ) and countermovement (CMJ), specifically with the tests: 400 m swimming, functional power test in cycling (FTP) and 3000 m running. A descriptive analysis was performed and all variables were correlated with each other. Results: The pace per 100 m in swimming had significant correlations with the wingspan (r = -0.511; p = 0.043), the forearm length (r = -0.619; p = 0.010) and the muscle mass (r = -0.619; p = 0.010). The latter also correlated with a better pace per kilometer in the run (r = - 0.534; p = 0.033). The FTP in cycling correlated with the CMJ jumps (r = 0.689; p = 0.003), SJ (r = 0.570; p = 0.021) and with the percentage of fat (r = - 0.711; p = 0.002). Conclusion: The relationship between body composition and physical performance in the triathletes studied, is manifested differently according to each specific test, revealing the importance of muscle mass in the pace of swimming and running and fat in functional power in cycling.

Palabras clave: Triathlon, performance, explosive strength, muscle mass.

INTRODUCCIÓN

El triatlón en las tres disciplinas que lo constituyen y según la distancia en que se compita, tiene características específicas que establecen necesidades fisiológicas, morfológicas y psicológicas en los deportistas (Cejuela *et al*., 2007). En las competiciones de media distancia se han identificado como variables determinantes para el rendimiento el VO_2max, umbral láctico y la eficiencia energética (Millet *et al*., 2014; Sleivert y Rowlands, 1996) y se han reconocido las demandas de fuerza durante los largos recorridos de competencia (Aurell-Badenas *et al*., 2020). Por su parte, la composición corporal influye en la eficiencia energética, pues niveles adecuados de masa muscular no solo favorecen la fuerza, si no que su adecuada funcionalidad influye en el metabolismo energético (Saunders *et al*., 2004); por su parte, un óptimo porcentaje de grasa corporal permite mayor eficiencia del movimiento (Torres Navarro *et al*., 2016), además de asegurar

*Autor para correspondencia: Diego Camilo García-Chaves
Correo-e: diego.garcia@endeporte.edu.co
Recibido: 6 de Marzo de 2024
Aceptado: 16 de Agosto de 2024
Publicado: 17 de septiembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2283

reservas energéticas (Vivas, 2019). Otras características morfológicas como diámetros, longitudes o perímetros pueden relacionarse con mayor ventaja mecánica en cada una de las disciplinas (Canda *et al*., 2014; Cuba y García-García, 2014; Ferriz-Valero *et al*., 2019; Landers *et al*., 2013).

Varios estudios relativos al triatlón que han incluido deportistas aficionados y élite, son caracterizaciones (Ortiz *et al*., 2022; Sanhueza *et al*., 2017; Silva *et al*., 2012) y aquellos realizados con deportistas de altos logros destacan por la poca cantidad de sujetos o son estudios de caso (Barbosa *et al*., 2023; Restrepo y Avella, 2018). Se ha determinado que el componente graso tiene una relación inversamente proporcional con el rendimiento deportivo en ciclismo y atletismo (Knechtle *et al*., 2011; van der Zwaard *et al*., 2019), así como también, la longitud de los segmentos corporales marca la diferencia en el rendimiento físico principalmente de natación (Beretic *et al*., 2023; Lätt, 2010) prevaleciendo un mejor rendimiento con segmentos corporales más largos, así como también, se establece que el CMJ es una variable que permite hacer seguimiento al rendimiento físico en diferentes disciplinas deportivas (Aurell-Badenas *et al*., 2020; Fuentes-Barria *et al*., 2020).

Pocos estudios han establecido correlaciones entre variables de rendimiento físico específico en triatlón y las antropométricas, entre ellas la composición corporal (Ferriz-Valero *et al*., 2019; Rivas *et al*., 2015) valorando en su conjunto las tres pruebas que constituyen esta disciplina. Se han investigado independientemente pruebas de natación y ciclismo de ruta en triatletas encontrándose que se requiere exigencias específicas para cada deporte, de acuerdo a su nivel, categoría y experiencia competitiva (Casas *et al*., 2017; Lätt, 2010; Niño y Leguizamo, 2020; Torres, 2020). Son menos los estudios que han correlacionado variables de composición corporal con el desempeño físico en el conjunto de las tres pruebas en deportistas de nivel amateur (Sanhueza *et al*., 2017). De igual manera, se encuentran pocas correlaciones entre el rendimiento físico especifico en triatlón y la fuerza explosiva (Coso *et al*., 2012; Robert *et al*., 2020).

Toda vez que las demandas fisiológicas en cada una de las pruebas que conforman las carreras de triatlón (natación ciclismo y carrera a pie) son específicas y más aún, en función del tipo de prueba (corta, media o larga), se considera que todavía falta más entendimiento sobre cómo se relacionan las variables de composición corporal con las de rendimiento físico específico en triatletas de media distancia. Esclarecer este aspecto es importante por la posibilidad de determinar parámetros que permitan direccionar los procesos deportivos de estas categorías para la mejora continua y la consecución de resultados. Con todo lo anterior, este estudio se propuso como objetivo determinar la relación entre composición corporal y desempeño físico en triatletas de media distancia de nivel aficionado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El enfoque de esta investigación es cuantitativo con un diseño no experimental, transversal y de alcance correlacional.

Participantes

Fueron evaluados 16 hombres entrenados en triatlón de media distancia (edad 37,3 ± 4,9 a, peso 69,2 ± 13,8 kg, talla 170,7 ± 10,7cm), competidores en la categoría grupos por edad y pertenecientes a un club de triatlón regional de nivel aficionado. Todos debían tener mínimo un año de experiencia en la práctica de triatlón y estar activos en el proceso de entrenamiento; fueron captados por medio de un muestreo no aleatorio y por conveniencia.

Todos los participantes fueron previamente informados del objetivo de la investigación, incluyendo procedimientos, riesgos y beneficios, aprobando voluntariamente su participación mediante consentimiento informado. La protección de datos se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, actualizada en 2013 en Fortaleza, Brasil (Droppelmann *et al*., 2023) y lo dispuesto en la normatividad colombiana (Resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud sobre investigación en salud y la Ley 1581 de 2012, sobre protección de datos personales). Los procedimientos de este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, Cali-Colombia bajo el acta 40.07.269 del 19 de septiembre del 2022.

Procedimientos e instrumentos

Se registraron datos de identificación como: nombre, edad y tiempo de práctica; medidas antropométricas y pruebas de desempeño físico en natación, ciclismo y atletismo, además de las alturas de los saltos Squat Jump (SJ) y salto en contramovimiento (CMJ por sus siglas en inglés).

En relación con las medidas antropométricas, la talla se midió con un tallímetro Seca 213 portátil (60-200 cm; precisión de 1 mm), el peso con una báscula Terraillon Fitness Coach Premium (0-160 kg; precisión de 100 g), los perímetros con una cinta métrica Lufkin W606PM (0 - 200 cm; precisión de 1 mm), los pliegues cutáneos con un cáliper Slim Guide (0 - 75mm; precisión de 0.5 mm) y los diámetros con el antropómetro corto 16 cm Cescorf (0 - 164 mm; precisión de 1 mm). Los pliegues cutáneos medidos fueron: Pierna, muslo, abdominal, supraespinal, tricipital, subescapular, cresta iliaca y bicipital. Para los perímetros corporales se midió cintura, cadera, antebrazo, brazo relajado, brazo contraído, pierna, muslo medio, y para los diámetros óseos se midió el fémur, humero y biestiloideo. Todos los procedimientos de medición de las variables mencionadas se llevarán a cabo según protocolos de la ISAK (International Society for the Advancement of Kinanthropometry) (Stewart *et al*., 2011).

La composición corporal se estableció teniendo en cuenta el porcentaje de grasa, la masa muscular y la masa ósea, según el documento de Consenso del Grupo Español de Cineantropometría (GREC) de la Federación Española de Medicina del Deporte (Alvero *et al*., 2009). Las fórmulas utilizadas en este estudio fueron la fórmula de Faulkner (1958), la fórmula de Lee *et al*., (2000) y la fórmula de Rocha (1975), respectivamente.

Todas las medidas antropométricas las realizó un evaluador con certificación de la International Society for the

Advancement of Kinanthropometry (ISAK) nivel II, siguiendo los parámetros antropométricos necesarios para determinar el perfil restringido establecido por la ISAK presentando un error técnico de medición (ETM) intraobservador de 5.0 % para pliegues y el 1.0 % para perímetros y diámetros (Stewart *et al*., 2011).

Para valorar el desempeño físico específico se realizó el test de 400 m de natación desarrollado en piscina de 25 m con un carril para cada deportista, buscando recorrer la distancia planteada en el menor tiempo posible. El tiempo de ejecución se controló por medio de cronómetro. El calentamiento que se llevó a cabo para la prueba de natación fue iniciar con 3 repeticiones de 100 m libre en intensidad suave, continuando con 2 repeticiones de 50 m en patada de libre con la misma intensidad, por último 4 repeticiones de 25 m en libre a intensidad submaxima. Las recuperaciones entre repeticiones fueron de 40 s en cada una (Ferriz-Valero *et al*., 2019; González *et al*., 2005).

Como prueba específica de ciclismo se realizó el test de potencia funcional (FTP) (Niño & Leguizamo, 2020) como variable importante para el desarrollo de pruebas como el triatlón de media distancia. En esta prueba se utilizó el simulador con medición de potencia Tacx NEO 2T Smart, el cual se sincronizo con el reloj Polar Vantage V2, la banda de frecuencia cardiaca H10 y la bicicleta personal de cada triatleta. El calentamiento para esta prueba inició con 5 min de rodaje continuo a intensidad baja, seguido de esto se realizaron 2 repeticiones de 2 min a intensidad media con 1 min de recuperación, posteriormente se realizaron 2 repeticiones de 1 min a intensidad sub máxima con 1 min de recuperación y por último 2 min de rodaje muy suave. Posteriormente se realizó la prueba principal donde el triatleta debía pedalear 20 min a la máxima intensidad posible, para finalizar con 5 min de recuperación a intensidad baja.

Para la evaluación del segmento de atletismo se realizó el test de 3000 m en pista homologada a la máxima velocidad posible, siendo controlado por medio de la banda de frecuencia cardiaca Polar H10 y reloj con GPS Polar Vantage V2. El calentamiento para la prueba de atletismo se inició con 5 min de trote suave, seguido por 10 min de técnica de carrera sobre 20 m.

Para la medición de la Fuerza explosiva se utilizó el sensor fotoeléctrico Wheeler Jump de marca Wheeler Tech (Colombia), el cual permite estimar la altura de salto por medio del tiempo de vuelo (Patiño-Palma *et al*., 2022). Se evaluó la altura del salto SJ, en donde el deportista iniciaba en posición de flexión de rodillas, cercano a los 90°, con las manos en su cadera y posterior a 5 s en esa posición, realizaba un máximo esfuerzo para lograr el mayor tiempo de vuelo, la mayor altura y potencia de ejecución. Así mismo, se realizó el salto CMJ, en donde el deportista iniciaba en una posición totalmente vertical, con las manos en la cintura y al dar la señal de inicio, realizaba una flexión de rodillas hasta la posición más cómoda y un posterior despegue de máxima intensidad, buscando también, la máxima altura y potencia. De los saltos anteriormente mencionados se realizaron 2 intentos para cada uno, con un minuto de recuperación entre cada uno con el objetivo de tomar el mejor registro para el posterior análisis (Moran *et al*., 2017).

Análisis estadístico

Toda la información de las mediciones se registró en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y posterior a la depuración de los datos ello se realizó el procesamiento en el software SPSS (IMB Corporation, USA) versión 26.0 para MAC. Se realizó un análisis descriptivo con medidas de tendencia central y dispersión. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para comprobar el supuesto de normalidad de los datos, así mismo, por medio de la correlación de Pearson se estableció la relación entre todas las variables con un nivel de significancia $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, en la tabla 1 se presenta el análisis descriptivo de la composición corporal y el desempeño físico específico de los triatletas aficionados en estudio.

Tabla 1. Características de las dimensiones totales del cuerpo, la composición corporal y el desempeño físico en triatletas aficionados (n=16).
Table 1. Characteristics of overall body dimensions, body composition and physical performance in amateur triathletes (n=16).

	Media (D.E)	IC 95%		Prueba de normalidad (sig)
Peso (kg)	62,2 (13,80)	61,85	76,55	0,936
Talla (cm)	170,69 (10,74)	164,97	176,41	0,967
Talla sentado (cm)	90,43 (5,06)	87,74	93,13	0,910
Envergadura (cm)	173,04 (13,01)	166,11	179,98	0,965
Longitud de brazo (cm)	32,13 (2,67)	30,71	33,55	0,925
Longitud de antebrazo (cm)	26,77 (2,46)	25,46	28,08	0,976
Longitud de mano (cm)	19,41 (1,66)	18,53	20,3	0,915
Longitud de muslo (cm)	43,17 (3,39)	41,36	44,98	0,990
Longitud de pierna (cm)	45,94 (3,85)	43,89	47,99	0,919
Masa muscular (kg)	35,81 (5,90)	32,66	38,95	0,909
Masa ósea (kg)	11,02 (2,06)	5,15	26,55	0,901
Porcentaje de grasa (%)	13,84 (3,25)	12,11	15,58	0,910
SJ Altura (cm)	26,13 (5,34)	23,28	28,98	0,990
CMJ Altura (cm)	27,38 (6,27)	24,03	30,72	0,910
Ritmo natación x 100m (min)	2,00 (0,00)	1,83	2,16	0,968
FTP Ciclismo (W/Kg)	2,67 (0,01)	2,33	3,02	0,938
Ritmo carrera a pie x 1km (min)	4,37 (0,01)	4,16	4,59	0,880

D.E: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza para la media; Prueba de normalidad: Shapiro-Wilk

Según lo observado en la tabla 1, en la composición corporal, los valores para el componente graso fueron inferiores a los de triatletas Chilenos aficionados que corren media distancia (Sanhueza *et al*., 2017), pero superiores a

los de triatletas de alto rendimiento (Anjos *et al*., 2003), lo que confirma que el porcentaje de grasa en un menor nivel competitivo es superior al de elite de distancia sprint, pues la composición corporal se ve determinada, no solo por las características de la prueba en la que se compite, sino también por el nivel deportivo, el proceso de preparación y el soporte nutricional que se tenga (Arencibia *et al*., 2017). Sobre la masa muscular, los valores de nuestro estudio fueron mayores a los de triatletas varones universitarios (Guillén *et al*., 2015), aunque resultaron menores, en comparación con triatletas de distancia sprint, donde también se encontraron promedios más altos para el peso corporal y más bajos para la grasa (García-Pinillos *et al*., 2016). De igual manera, el peso de los triatletas de nuestro estudio fue inferior al de ciclistas aficionados con edades entre 40 y 60 años que tenían una talla muy similar (Alvero-Cruz *et al*., 2021).

Todo lo anterior refleja que las características del deporte, su nivel competitivo y también de las modalidades en las que se entrena, van a modular la composición corporal de los deportistas; la misma, también evidencia la especificidad del deporte tal como se ha descrito en corredores de velocidad de alto rendimiento (Balsalobre *et al*., 2012), jugadores baloncesto universitario (Corredor-Serrano *et al*., 2022), Taekwondistas de nivel nacional (Ojeda-Aravena *et al*., 2021) y Jugadores de rugby sevens universitarios (Madroñero *et al*., 2023). En todos, la composición corporal varía de acuerdo a las necesidades específicas del deporte y el nivel competitivo.

Sobre el desempeño físico, no se hallaron referentes de comparación en población similar con las pruebas específicas usadas en nuestro estudio, aunque sí para las pruebas de salto. De este modo, se constató que nuestros valores de SJ y CMJ en todos los casos resultaron inferiores en contraste con los de triatletas no profesionales con una experiencia mínima de 2 años (Aurell-Badenas *et al*., 2020), triatletas entrenados en media distancia (Coso *et al*., 2012), triatletas corredores de distancia sprint y Ironman (García-Pinillos *et al*., 2017).

En relación con el objetivo principal de este estudio, que fue determinar la relación entre la composición corporal y el desempeño físico en los triatletas aficionados que corren pruebas de distancias medias, en la Tabla 2 se muestran sólo las correlaciones que fueron significativas entre las dimensiones totales del cuerpo, la composición corporal y las pruebas de desempeño físico. Allí se puede observar que entre los grupos de variables correlacionadas hubo valores de r que variaron de moderados a altos reflejando un grado de asociación significativo entre esas variables.

Tabla 2. Correlaciones significativas entre dimensiones totales del cuerpo, composición corporal y pruebas de desempeño físico.
Table 2. Significant correlations between total body dimensions, body composition and physical performance tests.

	Natación ritmo x 100m	Ciclismo FTP (W/Kg)	Carrera a pie ritmo 1km
Envergadura	-0,511* (p=0,043)		
Longitud de antebrazo	-0,610* (p=0,010)		
Masa Muscular	-0,660* (p=0,005)		-0,534* (p=0,033)
Porcentaje de grasa		-0,711* (p=0,002)	
Squat Jump		0,570* (p=0,021)	
CMJ		0,689* (p=0,003)	

*Correlación significativa p<0.05.

El ritmo en la prueba de natación tuvo más relación con las longitudes que con la composición corporal. En todos los casos se obtuvieron correlaciones inversas lo que significa que, a mayor envergadura, longitud de antebrazo y masa muscular, menor tiempo, reflejando un mejor ritmo de nado en 100 m. Otros estudios han reportado relaciones significativas similares, como es el caso entre la envergadura y la velocidad media en 400 m de natación, al igual que con un mejor desempeño y eficiencia en el nado (Anjos *et al*., 2003; Beretic *et al*., 2023; Lätt, 2010). También, en otro estudio se encontró que los triatletas con una longitud del antebrazo mayor tienden a tener un desempeño superior en comparación con aquellos con un antebrazo más corto (Lätt, 2010). Esta relación se ha explicado en nadadores, indicándose que una mayor longitud del antebrazo permite generar más fuerza propulsora durante la fase de tracción, por lo tanto, lograr un menor tiempo en la prueba y mejorar la eficiencia de nado (Lätt, 2010). Sobre la asociación entre la mejora del desempeño en natación y la masa muscular aquí encontrada, es sabido que una mayor proporción de músculo permite generar más fuerza y optimizar la capacidad para superar la resistencia del agua, resultando en una mejora de la velocidad de nado (Morouço *et al*., 2012).

Por otra parte, en nuestros resultados de la prueba de ciclismo expresados en términos de potencia relativa (W/Kg), hubo más relación con las pruebas de salto, aunque con el porcentaje de grasa se presentó una correlación inversa con el valor de r más alto de todo el análisis. En este caso, se corrobora lo planteado por Van Der Zwaard *et al*. (2019), sobre al hecho que un bajo porcentaje de grasa corporal se asocia con una mejor potencia y resistencia en pruebas de ciclismo. Del mismo modo, se ratifica lo hallado en otros estudios que develaron relaciones inversas entre el componente graso con el tiempo de carrera (Knechtle *et al*. 2011), asunto que había sido previamente descrito en el caso del triatlón (Landers *et al*., 2000).

Sobre las pruebas de desempeño físico, en nuestro estudio se hallaron correlaciones significativas entre el FTP en ciclismo y las pruebas de salto SJ y CMJ. Estas pruebas han sido recurrentemente usadas en otros estudios que han develado relaciones similares entre la capacidad de salto vertical con otras capacidades condicionales y/o en otros deportes o en test donde se pedalea; como en el caso del BMX, donde se reportó una relación directa entre el tiempo empleado en completar un circuito con la altura de salto SJ, CMJ y Drop Jump (Robert *et al*., 2020). Asimismo, en otro estudio se encontraron correlaciones positivas entre tiempo de vuelo del CMJ con la eficiencia mecánica, la potencia media y máxima desarrollada en el test de Wingate por ciclistas de

alto nivel (Muriel *et al*, 2012). Y específicamente en el triatlón, la relación se ha establecido valorando niveles de fatiga tras una contrarreloj de 40 Km y donde se hallaron reducciones en la altura del SJ y CMJ, lo que a su vez afecta el desempeño en la carrera a pie (Aurell-Badenas *et al*., 2020).

Otros estudios, similar a lo aquí encontrado, refuerzan la idea que los saltos SJ y CMJ guardan relación con varias capacidades físicas y en diferentes tipos de deportistas, como es el caso de la capacidad aeróbica en corredores aficionados (Fuentes-Barria *et al*., 2020), la velocidad en 20 m y 30 m lanzados en deportistas de velocidad (Jiménez-Reyes *et al*., 2011) y el tiempo en una prueba de 300 m en patinadores juveniles (González y Mendoza, 2017).

Sobre la prueba de FTP utilizada en este estudio para establecer el desempeño físico especifico de los triatletas aficionados, es importante anotar que ésta se encuentra fuertemente correlacionada con el umbral de lactato (Niño y Leguizamo, 2020), siendo un factor determinante para el desarrollo del triatlón de media distancia; por lo cual, hallar correlaciones significativas, moderadas y altas con el CMJ y el SJ, amplía la base de información sobre el potencial de dichas pruebas como reflejo de la condición física específica y aporta datos para su uso como medio de control en el triatlón, especialmente para valorar el estado de preparación frente al desempeño en el segmento de ciclismo de un triatlón de media distancia (García-Pinillos *et al*., 2017), muy importante por ser un gran predictor para el rendimiento en esta prueba (Sousa *et al*., 2021).

Por último, la carrera a pie, a través del registro del ritmo por kilómetro sólo correlacionó con una variable que fue la masa muscular, lo que sumado la relación ya comentada sobre un menor porcentaje de grasa con el mejor desempeño en cuanto a potencia relativa (w/kg) en la prueba FTP en la prueba de ciclismo, muestra que hay un grado de asociación significativo entre cada una de las disciplinas que compone el triatlón y la composición corporal, por lo que futuros estudios deberán esclarecer su nivel de influencia en el rendimiento general de la prueba.

Los resultados de este estudio deben valorarse teniendo en cuenta las siguientes limitaciones: primero, la cantidad de deportistas evaluados es relativamente baja por lo que procedería validar lo aquí encontrado con un mayor número de sujetos. En segunda instancia, el hecho que los resultados encontrados representan exclusivamente las características de la población estudiada. No obstante, las relaciones aquí halladas aportan información valiosa para el conocimiento de las características específicas de triatletas colombianos de nivel aficionado que compiten en pruebas de distancias medias y suman al cuerpo de evidencia existente sobre relaciones entre composición corporal y desempeño físico en este deporte.

CONCLUSIONES

La relación entre composición corporal y rendimiento físico en los triatletas aficionados que compiten en pruebas de media distancia, se manifiesta diferenciadamente según cada prueba específica (400 m libre en natación, 3000 m de carrera a pie y FTP en ciclismo), revelando la importancia de la masa muscular en el ritmo de carrera en natación y a pie, así como la implicación de la grasa en la potencia funcional en ciclismo. Otras variables también guardan relación significativa con el desempeño físico en los segmentos del triatlón, como las longitudes de miembros superiores en natación o la capacidad de salto vertical en el ciclismo. Esto revela la importancia de la composición corporal y los saltos en el control del entrenamiento para estos deportistas y de las longitudes como parámetro para detección de talentos en edades tempranas. Futuros estudios deberán esclarecer el potencial de estas pruebas de control para la predicción del rendimiento en cada uno de los segmentos del triatlón o en el rendimiento global en la modalidad de media distancia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del estudio manifestamos que el documento en mención es original y de autoría propia, aceptamos que hemos contribuido en 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

Alvero, J.R., Cabañas, M.D., Herreno, A., Martínez, L., Moreno, C., Porta, J., Sillero, M., y 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*(131), 166-179. http://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulo/es/43/2001/409/

Alvero-Cruz, J.R., García Romero, J.C., Ordoñez, F.J., Mongin, D., Correas-Gómez, L., Nikolaidis, P.T., y Knechtle, B. 2021. Age and training-related changes on body composition and fitness in male Amateur cyclists. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(1), 93. https://doi.org/10.3390/ijerph19010093

Anjos, M.A., Fernández, J., y Novaes, J. 2003. Características antropométricas, dermatoglíficas y fisiológica del atleta de triatlón. *Fitness & Performance Journal*, *2*(1), 49-57. https://doi.org/10.3900/fpj.2.1.49.s

Arencibia, R., Hernández, D., Linares, G., Naranjo, J., Troya, M., y Linares, M. 2017. Perfil antropométrico y energético nutricional del equipo de rugby Cerberos RFC masculino, Cerberos Rugby Football Club, Quito. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, *37*(2), 28-35. https://doi.org/10.12873/372arencibia

Aurell-Badenas, V., Murias-Lozano, R., Rodríguez-López, E.S., y García-Giménez, A. 2020. Eficacia de la pliometría en la fatiga neuromuscular en triatlón: estudio piloto. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de La Actividad Física y Del Deporte*, *20*(79), 551-566. https://doi.org/10.15366/rimcafd2020.79.011

Balsalobre, C., Del Campo, J., Tejero, C., y Alonso, D. 2012. Relación entre potencia máxima, fuerza máxima, salto vertical y sprint de 30 metros en atletas cuatrocentistas de alto rendimiento.

Apunts Educación Física y Deportes, *108*, 63-69. https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.(2012/2).108.07

Barbosa, J.G., de Lira, C.A.B., Vancini, R.L., dos Anjos, V.R., Vivan, L., Seffrin, A., Forte, P., Weiss, K., Knechtle, B., y Andrade, M.S. 2023. Physiological features of olympic-distance amateur triathletes, as well as their associations with performance in women and men: A cross–sectional study. *Healthcare (Switzerland)*, *11*(4). https://doi.org/10.3390/healthcare11040622

Beretic, I., Romanov, R., y Stupar, D. 2023. The relationship between anthropometric variables and swimming efficiency in early pubescent female front crawl swimmers. *International Journal of Morphology*, *41*(1), 303-307. https://doi.org/10.4067/S0717-95022023000100303

Canda, A.S., Castiblanco, L.A., Toro, A.N., Amestoy, J.A., y Higueras, S. 2014. Características morfológicas del triatleta según sexo, categoría y nivel competitivo. *Apunts Medicina de l'Esport*, *49*(183), 75-84. https://doi.org/10.1016/j.apunts.2013.12.004

Casas, H., Leguizamo, J., Caro, W., y Agudelo, C. 2017. Perfil de potencia de un equipo profesional de ciclistas ruteros. *Viref Revista de Educacion Fisica*, *6*(4), 160-170. https://revistas.udea.edu.co/index.php/viref/article/view/329475

Cejuela, R., Pérez, J., Villa, J., Cortell, J., y Rodríguez, J. 2007. Análisis de los factores de rendimiento en triatlón distancia sprint. *Journal of Human Sport and Exercise*, *2*(2), 1-25. https://doi.org/10.4100/jhse.2007.22.01

Corredor-Serrano, L.F., García-Chaves, D.C., y 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

Coso, J. Del, González-Millán, C., Salinero, J.J., Abián-Vicén, J., Soriano, L., Garde, S., y Pérez-González, B. 2012. Muscle damage and its relationship with muscle fatigue during a half-iron triathlon. *PLoS ONE*, *7*(8), e43280. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043280

Cuba, A., y García-García, O. 2014. Los factores de rendimiento en triatlón como base para la detección de talentos. *Revista Española De Educación Física Y Deportes*, *407*(5), 49-60. https://doi.org/https://doi.org/10.55166/reefd.v0i407.16

Droppelmann, G., Morán, M., y Kalazich, C. 2023. Consentimiento informado en medicina del deporte: un ejemplo. *Revista Observatorio Del Deporte*, *9*(2), 1-23. https://doi.org/10.58210/odep300

Faulkner, J. 1958. *Physiology of swimming and diving* (H. Falls, Ed.). Exercise Physiology. Baltimore- Academic Press.

Ferriz-Valero, A., Martínez-Sanz, J.M., Fernández-Sáez, J., Sellés-Pérez, S., Cejuela-Anta, R., y Ferriz Valero, A. 2019. Perfil antropométrico de jóvenes triatletas y su asociación con variables de rendimiento. *Archivos de Medicina Del Deporte*, *37*(3), 169-175. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7603229

Fuentes-Barria, H., Valenzuela-Pérez, D., y Fuentes-Kloss, R. 2020. Relationship between aerobic capacity and jumping as strategy for optimizing athletic performance in amateur runners. *Revista PODIUM*, *15*(2), 360-370. http://scielo.sld.cu/pdf/rpp/v15n2/en_1996-2452-rpp-15-02-360.pdf

García-Pinillos, F., Cámara-Pérez, J.C., González-Fernández, F.T., Párraga-Montilla, J.A., Muñoz-Jiménez, M., y Latorre-Román, P.Á. 2016. Physiological and neuromuscular response to a simulated sprint-distance triathlon. *Journal of Strength and Conditioning Research*, *30*(4), 1077-1084. https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001172

García-Pinillos, F., Cámara-Pérez, J.C., Soto-Hermoso, V.M., y Latorre-Román, P.Á. 2017. A high intensity interval training (HIIT)-based running plan improves athletic performance by improving muscle power. *Journal of Strength and Conditioning Research*, *31*(1), 146-153. https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001473

González, C., Galilea, P., Drobnic, F., y Padullés, J. 2005. Validación de un test de natación, evaluando la velocidad aeróbica máxima (VAM) para calcular los ritmos de entrenamiento para triatletas y nadadores. *Apunts Educación Física y Deportes*, *79*, 94-99. https://raco.cat/index.php/ApuntsEFD/article/view/300989

Guillén, L., Mielgo-Ayuso, J., Norte-Navarro, A., Cejuela, R., Cabañas, M., y Martínez-Sanz, J. 2015. Composición corporal y somatotipo en triatletas universitarios. *Nutrición Hospitalaria*, *32*(2), 799-807. https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9142

Knechtle, B., Knechtle, P., Rüst, C.A., y Rosemann, T. 2011. A comparison of anthropometric and training characteristics of Ironman triathletes and Triple Iron ultra-triathletes. *Journal of Sports Sciences*, *29*(13), 1373-1380. https://doi.org/10.1080/02640414.2011.587442

Landers, G.J., Blanksby, B.A., Ackland, T.R., y Smith, D. 2000. Morphology and performance of world championship triathletes. *Annals of Human Biology*, *27*(4), 387-400. https://doi.org/10.1080/03014460050044865

Landers, G., Ong, K., Ackland, T., Blanksby, B., Main, L., y Smith, D. 2013. Kinanthropometric differences between 1997 World championship junior elite and 2011 national junior elite triathletes. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *16*(5), 444-449. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.09.006

Lätt, E. 2010. Indicadores fisiológicos, biomecánicos y antropométricos del rendimiento del esprint de natación en nadadores adolescentes. *PubliCE*, *1*(1), 2010. https://journal.onlineeducation.center/api-oas/v1/articles/sa-G57cfb271ebab3/export-pdf/indicadores-fisiologicos-biomecanicos-y-antropometricos-del-rendimiento-del-esprint-de-natacion-en-nadadores-adolescentes-1295?_gl=1*1l1jpxj*_ga*NzgxNzQ4NDE2LjE3MDk2NjcyNDc.*_ga_VZZRDR12S5*MTcwOTY2NzI0Ny4xLjEuMTcwOTY2NzI5Ni4xMS4wLjA.

Lee, R., Wang, Z., Heo, M., Ross, R., Janssen, I., y Heymsfield, S. 2000. Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*, 796-803. https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.796

Madroñero, J., Castellar, J., Gutiérrez, S., García-Chaves, D., y Corredor-Serrano, L. 2023. Asociación entre la composición corporal, fuerza explosiva y algunos parámetros de desempeño físico en los jugadores del rugby sevens universitario. *Biotecnia*, *25*(3), 146-153. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.2102

Millet, G., Vleck, V., y Bentley, D. 2014. Demandas fisiológicas del triatlón. *PubliCE*. https://g-se.com/demandas-fisiologicas-del-triatlon-1732-sa-a57cfb27244fe0

Moran, J., Sandercock, G.R.H., Ramírez-Campillo, R., Todd, O., Collison, J., y Parry, D.A. 2017. Maturation-related effect of low-dose plyometric training on performance in youth

hockey players. *Pediatric Exercise Science*, *29*(2), 194-202. https://doi.org/10.1123/pes.2016-0151

Morouço, P.G., Marinho, D.A., Amaro, N.M., Pérez-Turpin, J.A., y Marques, M.C. 2012. Effects of dry-land strength training on swimming performance: a brief review. *Journal of Human Sport and Exercise*, *7*(2), 553-559. https://doi.org/10.4100/jhse.2012.72.18

Niño, W., y Leguizamo, J. 2020. Correlación entre el umbral funcional de potencia (ftp) y el umbral de lactato en los ciclistas del equipo "Boyacá es para vivirla". *Revista Salud, Historia y Sanidad On-Line*, *15*(1), 11-15. https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.4682251

Ojeda-Aravena, A., Azocar-Gallardo, J., Hernández-Mosqueira, C., y Herrera-Valenzuela, T. 2021. Relación entre la prueba de agilidad específica en taekwondo (tsat), la fuerza explosiva y la velocidad lineal 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

Ortiz, M., Aguirre, H., Ramírez, A., Walkup, L., y Villarreal, M. 2022. Perfil morfo funcional de triatletas que representan al estado de Durango en Olimpiada Nacional. *Revista de Ciencias Del Ejercicio FOD*, *16*(2), 32-42. https://doi.org/10.29105/rcefod16.2-52

Patiño-Palma, B., Wheeler-Botero, C., y Ramos-Parrací, 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

Restrepo, C., y Avella, R. 2018. Caracterización de la composición corporal, el perfil dermatoglífico, el consumo máximo de oxígeno (Vo2 máx.) Y la fuerza prensil en la selección Bogotá de triatlón. *Revista Digital: Actividad Física y Deporte*, *2*(1), 38-49. https://doi.org/https://doi.org/10.31910/rdafd.v2.n1.2016.325

Rivas, L.G., Mielgo-Ayuso, J., Norte-Navarro, A., Cejuela, R., Cabañas, M.D., y Martínez-Sanz, J.M. 2015. Body composition and somatotype in university triathletes. *Nutrición Hospitalaria*, *32*(2), 799-807. https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9142

Robert, P., Cirer-Sastre, R., López-Laval, I., Matas-García, S., Álvarez-Herms, J., Julià-Sánchez, S., y Corbi, F. 2020. Relationship between jump capacity and performance in BMX cycling. *Apunts Educación Física y Deportes*, *140*, 37-43. https://doi.org/10.5672/apunts.2014-0983.es.(2020/2).140.06

Rocha, M. 1975. Peso ósseo do brasileiro de ambos os sexos de 17 a 25 años. *Arquivos de Anatomía e Antropología*, *1*, 445-451.

Sanhueza, J.A., Bahamondes-Ávila, C., Hernández-Mosqueira, C., Abarzua-Mandiola, D., Zambrano, T., y Salazar, L.A. 2017. Características antropométricas de triatletas amateur Chilenos: Un estudio piloto. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, *21*(3), 271-279. https://doi.org/10.14306/renhyd.21.3.374

Saunders, P., Pyne, D., Telford, R., y Hawley, J. 2004. Factors affecting running economy in trained distance runners. *Sports Medicine*, *34*(7), 465-485. https://doi.org/10.2165/00007256-200434070-00005

Silva, D., Benedetti, T., Ferrari, E., Meurer, S., Antes, D., Silva, A., Santos, D., Matias, C., Sardinha, L., Vieira, F., y Petroski, E. 2012. Anthropometric profiles of elite older triathletes in the Ironman Brazil compared with those of young Portuguese triathletes and older Brazilians. *Journal of Sports Sciences*, *30*(5), 479-484. https://doi.org/10.1080/02640414.2011.647046

Sleivert, G., y Rowlands, D. 1996. Physical and physiological factors associated with success in the triathlon. *Sports Medicine*, *22*(1), 8-18. https://doi.org/10.2165/00007256-199622010-00002

Stewart, A., Marfell-Jones, M., Olds, T., y De Ridder, H. 2011. *International standards for anthropometric assessment*. International Society for the Advancement of Kinanthropometry ISAK.

Torres Navarro, V., Campos Granell, J., y Aranda Malavés, R. 2016. Influencia de la masa grasa para el VO2max y Umbrales Ventilatorios en jóvenes deportistas de especialidades deportivas de resistencia. *Sportis. Scientific Journal of School Sport, Physical Education and Psychomotricity*, *3*(1), 16-33. https://doi.org/10.17979/sportis.2017.3.1.1534

Torres, V. 2020. Composición corporal y somatotipo de jóvenes deportistas de alto nivel de atletismo, natación y triatlón. *Revista Española de Educación Física y Deportes*, *429*, 31-46. https://doi.org/10.55166/reefd.vi429.898

van der Zwaard, S., de Ruiter, C.J., Jaspers, R.T., y de Koning, J.J. 2019. Anthropometric clusters of competitive cyclists and their sprint and endurance performance. *Frontiers in Physiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01276

Vivas, Y. 2019. Perspectivas nutricionales para atletas practicantes en deportes de resistencia. *Revista Científica Caminos de Investigación*, *1*(1), 60-72. https://doi.org/10.59773/ci.v1i1.8

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo original

Creencias sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de crossfit

Beliefs about the risk of musculoskeletal injuries associated with the practice of crossfit

Andrés Castaño[1], Iván Jiménez[1], Jazbreydi Rosero[1], Melany Ramírez[1], Andrea Calvo[1]*
[1] Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte Cali, Colombia

RESUMEN

El entrenamiento de crossfit cada vez es más conocido en diversos niveles, ya que involucra múltiples disciplinas como el levantamiento olímpico, gimnasia, natación, atletismo, entre otras. Se ha demostrado que esta disciplina puede ser altamente lesiva en comparación con otro tipo de deportes. El objetivo fue describir las creencias sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de crossfit en deportistas de un centro de entrenamiento crossfit. Este estudio está clasificado como investigación cualitativa con enfoque hermenéutico, se realizó con el método inductivo, los participantes fueron hombres y mujeres practicantes de Crossfit. Los resultados mostraron que los participantes recalcan el aspecto físico, comparan los resultados de la disciplina con otros deportes y generan un compromiso hacia el crossfit. Se ven influenciados por terceros para iniciar y permanecer en la práctica. Creen que los facilitadores para lesiones son tener un entrenador poco capacitado e inadecuada técnica, dentro de las barreras los creen en la preparación física previa, el uso de elementos de protección y un entrenador capacitado. Se concluye que las creencias conductuales, normativas y de control, son fundamentales para que el practicante pueda desempeñarse en el deporte exitosamente.

Palabras clave: Modelo de Creencias sobre la Salud; Traumatismos en Atletas; Medicina Deportiva.

ABSTRACT

Crossfit training is becoming more and more known at various levels, as it involves multiple disciplines such as Olympic lifting, gymnastics, swimming, athletics, among others. It has been shown that this discipline can be highly injurious compared to other types of sports. The objective of this work was to describe the beliefs about the risk of musculoskeletal injuries associated with the practice of crossfit. This study is classified as qualitative research with hermeneutic approach, it was conducted with the inductive method, the participants were male and female Crossfit practitioners. The results showed that participants emphasize the physical aspect, comparing the discipline with other sports and generate a commitment to crossfit. They are influenced by third parties to start and stay in the practice. They believe that the facilitators for injuries are having a poorly trained trainer and inadequate technique, within the barriers they believe in previous physical preparation, the use of protective elements and a trained trainer. It is concluded that behavioral, normative and control beliefs are fundamental for the practitioner to be able to perform successfully in sport.

Keywords: Health Belief Model; Athletic Injuries; Sports Medicine.

INTRODUCCIÓN

El Crossfit (CF) es un programa o sistema de acondicionamiento físico de alto rendimiento (Tafuri *et al*., 2019), por lo que involucra y combina ejercicios de alta intensidad aeróbicos y anaeróbicos, logrando desarrollar en sus practicantes cualidades físicas, como la fuerza, velocidad, equilibrio y coordinación; además de influir en la parte emocional, se destaca que los practicantes ven en el CF siempre la superación de récords personales (Dominiski *et al*., 2018; Feito *et al*., 2018). Esta investigación reporta que el CF, trae una serie de beneficios para el bienestar y la salud de quienes lo realizan (Meyer *et al*., 2017), esta actividad ha venido creciendo, cada vez más personas muestran interés en esta disciplina, comúnmente desarrollada en poblaciones adulta y joven, llegando a incluir esta práctica deportiva como una parte de la rutina diaria (Feito *et al*., 2018), también en varios casos se realizan preparaciones para competiciones en diferentes categorías.

En el CF se realiza una práctica deportiva con un alto índice lesivo (Tafuri *et al*., 2019), dada su metodología de ejecución, como son los ejercicios funcionales, los cuales involucran a la vez diferentes grupos musculares a altas intensidades de entrenamiento (Meyer *et al*., 2017), y realizados de forma rápida, además con tiempos de recuperación cortos o en su defecto nulos (Feito *et al*., 2018). Un estudio realizado en Sao Paulo (Brasil) permitió identificar que las estructuras anatómicas más comprometidas en el CF son: el hombro y la zona lumbar, al igual se evidenció que las lesiones musculares tienen un alto índice de lesión, seguido de dolores articulares y tendinopatía (Queiroz *et al*., 2020).

Actualmente pese a la alta demanda del CF, es escasa la información que mencione las creencias de sus practicantes sobre lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de esta disciplina. Las creencias en este estudio se definen como componentes del conocimiento, poco elaborados y subjetivos, que no se fundamentan en la racionalidad, sino más bien sobre los sentimientos y las experiencias, lo que las hace ser muy consistentes y duraderas en el tiempo (Solis, 2015). Para el caso de las creencias, esta investigación tuvo en cuenta la teoría del comportamiento planificado, esta

*Autor para correspondencia: Andrea Calvo1
Correo-e: apcalvo@endeporte.edu.co
Recibido: 6 de marzo de 2024
Aceptado: 15 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2281

sostiene que la conducta humana es voluntaria y que los individuos toman decisiones racionales para participar (o no) en una conducta o comportamiento determinado. Las elecciones realizadas están influenciadas por las propias creencias de los individuos sobre el resultado y la evaluación de la ventaja (o desventaja) de involucrarse en el comportamiento objetivo (Santillan y Parra, 2020).

De acuerdo con los aspectos de la práctica del CF, la intensidad, el tiempo de ejecución y los tiempos de descanso influyen en las lesiones musculoesqueléticas, en el rastreo de información se identificó que las diferentes investigaciones consultadas no tienen en cuenta las creencias que tienen las personas sobre las lesiones musculoesqueléticas, derivadas de la práctica CF; sin embargo, realizaron hallazgos de creencias en otras prácticas deportivas, como en un estudio de entrenadores de fútbol en el que se evaluaron las modalidades de afrontamiento del estrés en jóvenes deportistas, se encontró que la estrategia más utilizada por los deportistas es la búsqueda de apoyo social (Martínez y Mux, 2018).

En otro estudio sobre creencias y conocimientos en el fútbol, se concluye que un conocimiento adecuado sobre la prevención de lesiones en el fútbol reduce la incidencia de lesiones y mejora el rendimiento (Franco, 2020). También se evidenciaron buenos resultados sobre un estudio del cambio de las creencias irracionales, en donde se da la intervención de psicología deportiva para cambiar el pensamiento en los deportistas de básquetbol, en el momento de una situación lesiva, desarrollando en el deportista actitudes negativas como la depresión (Rizeanu y Cordun, 2019).

Esta investigación buscó describir las creencias de los practicantes de CF frente a las lesiones musculoesqueléticas, los resultados pueden ser útiles para educar a los practicantes interesados en esta disciplina sobre los efectos que puede constituir la inadecuada realización de los ejercicios de CF, con lo que se hace énfasis en que la mayor parte de esta población no cuenta con la información necesaria para ejecutar los movimientos de manera correcta, con pesos correspondientes, posturas correctas y tiempos de descanso adecuados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio está clasificado como investigación cualitativa con enfoque hermenéutico, dicho enfoque asume el análisis de los aspectos más complejos de la vida humana, de aquello que se encuentra más allá de lo cuantificable, también pretende describir y entender los fenómenos desde el punto de vista de cada participante y desde la perspectiva construida colectivamente. Este estudio se realizó con el método inductivo, abordando a cada uno de los participantes para llegar a consensos sobre los riesgos de lesiones musculoesqueléticas.

Los participantes que fueron objeto de estudio fueron hombres y mujeres practicantes de CF que asistían al Box Ades en la ciudad de Guadalajara de Buga, tomando una muestra de 7 participantes. Se realizó un muestreo por conveniencia, se utilizó un cuestionario sociodemográfico y de descripción de la práctica del CF, también una entrevista estructurada. Las entrevistas realizadas fueron transcritas textualmente, a las cuales solo tenían acceso los investigadores, en estas no se tuvieron en cuenta datos personales de los participantes.

Las categorías de análisis estuvieron basadas en la teoría del comportamiento planificado, según las creencias conductuales, normativas y de control. Las creencias conductuales se refieren a las creencias percibidas sobre los resultados probables de involucrarse en el comportamiento objetivo y a la evaluación de la conveniencia de estos resultados; las creencias normativas tienen que ver con la presión social percibida, y las creencias de control tratan sobre la facilidad o dificultad percibida de involucrarse en el comportamiento deseado o no deseado (Santillan y Parra, 2020).

Una vez se hizo la transcripción de las entrevistas, se dio lectura a cada una llevando a cabo el proceso de codificación de los apartados que correspondían a cada una de las categorías preestablecidas, para posteriormente realizar el análisis de las mismas, se hizo a reducción del análisis, para poder llegar a entender las creencias sobre lesiones musculoesqueléticas de los practicantes de CF.

Esta investigación contó con el aval ético de la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, se realizó con los lineamientos que establece la resolución 8430 de 1993 (nacional) por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y la declaración de Helsinki (internacional) en la investigación con seres humanos (Declaración de Helsinki, 2004) y se clasifica en una investigación con riesgo mínimo (República de Colombia, 2012).

RESULTADOS

La edad de los participantes estuvo sobre los 22 a 28 años, la mayoría de los sujetos de estudio fueron hombres (n = 5), pertenecían a los estratos socioeconómicos 2 y 3, todos los participantes (n = 7) reportaron estudios superiores (Tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de los participantes de crossfit.
Table 1. Sociodemographic characteristics of CrossFit practitioners.

Nominación	Edad (años)	Género	Estrato socioeconómico	Nivel educativo
Sujeto 1	24	Femenino	2	Educación Superior
Sujeto 2	22	Masculino	3	Educación Superior
Sujeto 3	24	Masculino	4	Educación Superior
Sujeto 4	25	Masculino	3	Educación Superior
Sujeto 5	25	Femenino	3	Educación Superior
Sujeto 6	28	Masculino	2	Educación Superior
Sujeto 7	24	Masculino	2	Educación Superior

La mayoría de los participantes (n = 5) entrenaba 5 días a la semana, algunos participantes tenían participación en competencias (n = 4), solo uno de los participantes tenía

chequeos con fisioterapia a menudo y todos (n = 7) tenían sesiones de entrenamiento de hora y media (Tabla 2).

Tabla 2. Características deportivas de los practicantes de crossfit.
Table 2. Sports characteristics of CrossFit practitioners.

Tiempo práctica CF	Número días práctica	Número de horas de práctica	Frecuencia chequeos	Participación competencias
Sujeto 1	3 días	1 hora y 30 minutos	Casi nunca	No
Sujeto 2	5 días	1 hora y 30 minutos	Muy a menudo	Si
Sujeto 3	5 días	1 hora y 30 minutos	Pocas veces	Si
Sujeto 4	5 días	1 hora y 30 minutos	Pocas veces	Si
Sujeto 5	5 días	1 hora y 30 minutos	Casi nunca	Si
Sujeto 6	3 días	1 hora y 30 minutos	Casi nunca	No
Sujeto 7	5 días	1 hora y 30 minutos	Casi nunca	No

Creencias conductuales sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de crossfit

Las creencias conductuales se refieren a las creencias percibidas sobre los resultados probables de involucrarse en el comportamiento objetivo y a la evaluación de la conveniencia de estos resultados. A continuación, los aspectos relacionados con esta categoría:

Mejoras en el aspecto físico

Los deportistas tienen expectativas de cambios físicos corporales y en su condición física, al realizar el deporte, mencionando aspectos que le aporta el CF y que no habían sido brindados por otras prácticas deportivas (por ejemplo, gimnasio convencional), como se muestra en estos relatos:

Entrevistado 1: "*Sentía que no estaba rindiendo en el gimnasio convencional, tampoco me hacía sentir lo que yo esperaba, en lugar de motivarme me desmotivaba porque yo no veía cambios*".

Entrevistado 6: *"Pronto estaba buscando al principio bajar un poquito de peso entonces me metí en el cuento y se fueron dando las cosas*".

Satisfacción por el CF comparado con otros deportes

Los deportistas muestran desinterés hacia otros deportes, se sienten a gusto teniendo un alto grado de satisfacción por la práctica de CF o con su entrenador personal de confianza, ven en la disciplina algo más que otros deportes no les brinda.

Entrevistado 2: "*Creo que enfatizando en un solo deporte no podría conseguir igual los resultados, ya que en esta mezcla de lo que es le CF, pues puedo hacer trabajo de fuerza, como trabajos de velocidad como de otras capacidades en las cuales otros deportes me llevaba a enfocarme solo en uno, entonces considero que no totalmente*".

Entrevistado 7: "*Yo siento que es como la pasión o las ganas con la que uno lo haga, porque yo generalmente entrené muchos años esgrima y yo fui bueno en mi deporte, pero es las ganas con las que usted haga todo, siempre y cuando se haga con ganas si, si se hace con pasión siempre va generar cosas buenas*".

Creencias normativas sobre el riesgo lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de crossfit

Influencia social para el inicio de la práctica CF

Previo al deporte el practicante se ve influido por su entorno cercano como es: la familia, los amigos y la pareja, en cuanto al apoyo para comienzo de la práctica del CF. Así mismo, las relaciones sociales que se establecen en el espacio de la práctica del CF, con el grupo de deportistas en el box y en especial con el entrenador, llamado en ese entorno *coach*, quien facilita y motiva la práctica frecuente del deportista, siendo más que un entrenador es un motivador y facilitador.

Entrevistado 1: "*Por mi círculo social que practicaba este deporte, veía los videos de mis amigos entrenando y las conversaciones que ellos tenían respecto al deporte, me empezó a llamar bastante la atención hasta que me animé a probar*" [...] "*antes entrenaba en otro sitio, pero me salí porque el entrenador que había allí colocó su propio box y pues me gustan los entrenos de él, me parece que desde que entreno con él he podido mejorar*".

Entrevistado 2 *"Inicialmente por influencia de un grupo de amigos a entrenar este deporte*".

Creencias de control sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica de crossfit

Facilitadores de la práctica CF

Se identifican como todo aquello que favorezca la práctica deportiva, por parte de cambios físicos y comodidades para un fácil acceso de los deportistas.

Mejora del aspecto físico esperado

Se considera como una meta u objetivo, el cual durante la práctica se pueden ir observando mejoras y cambios físicos, al ser estos alcanzados por los deportistas, ellos sienten más motivación por la práctica deportiva, y no ven posible o difícilmente alcanzan estas mejoras con otro tipo de disciplinas deportivas.

Entrevistado 1: "*Tengo mayor rendimiento y me agrada físicamente como me veo, los cambios físicos que he tenido si son de mi agrado en comparación de cómo estaba antes, mi cuerpo actualmente responde de manera positiva*".

Entrevistado 2: "*Personalmente me sacó totalmente del sedentarismo, me ayudó a conocer personas y lugares nuevos, ehhh me ha ayudado a meterme en ámbito competitivo en el cual nunca había estado antes, y a superar mis límites, a demostrarme a mí mismo qué podido superar cualquier adversidad que se me presente*".

Aumento de la autoestima

Se da cuando el deportista a través de las experiencias durante la práctica del CF, logra aumentar la confianza en sí mismo, no solo en la parte deportiva sino también en su vida

personal, convirtiendo así la práctica deportiva en un hábito con el que logra hacer sentir orgullo de lo conseguido.

Entrevistado 1: "*Físicamente he mejorado bastante, personal me siento mejor conmigo misma, eeh es algo que llena me hace sentir bien y me motiva día a día*".

Entrevista 4: "*Muy excelente, siento que es muy completo en toda la palabra, y aparte de eso he visto personas tener resultados y cambios en su vida más rápido que en otro tipo de modalidades de ejercicios*".

Barreras para la práctica de CF

Se define como obstáculo o impedimento que retrasa la práctica o que impida poder realizarla de manera cómoda para los deportistas, que les permita confiar en las instalaciones y en el personal de trabajo.

Alto costo de mensualidad

Una de las principales barreras encontradas en la práctica de la disciplina por los practicantes de CF es el costo elevado del servicio, en comparación con un gimnasio convencional o algún otro deporte, pues ellos ven que, si el deporte fuera más asequible económicamente para otras personas, sería mucho más fácil probar esta disciplina.

Entrevistado 3: "*Porque inicialmente el costo es más elevado que un gimnasio normal*".

Entrevistado 4: "*Los obstáculos para practicar crossfit en el país actualmente son principalmente es el valor, porque se sabe que es prácticamente el doble de lo que cuesta una mensualidad en un gym convencional*".

Escaso conocimiento acerca del crossfit

Algunas de las personas que no han tenido contacto con la disciplina, no cuentan con los conocimientos más precisos acerca de la práctica, y solo se dejan llevar por lo que escuchan de otras personas, los entrevistados manifestaron que al practicar la disciplina pueden llegar a conocer mucho más del deporte.

Entrevistado 1: *"Al ser un deporte tan exigente muchas personas se bloquean y creen que no van a ser capaces de entrar al crossfit*".

Entrevistado 2: "*Las barreras más que todo que yo he conocido, ya que estoy en este deporte es que dictaminan que es muy lesivo, y no hay buen aprendizaje ni una buena explicación en eso desde la formación*".

Facilitadores de las lesiones musculoesqueléticas por la práctica de CF

Se manifiesta por parte de los entrevistados que muchos factores como el acompañamiento profesional es indispensable, para la prevención de muchas lesiones que se presentan dentro de esta práctica deportiva.

Presencia de un entrenador no capacitado

La importancia de tener un profesional deportivo capacitado se refleja muchas veces en los practicantes, por lo que el conocimiento se transfiere permitiendo ganar experiencia, mejorar las técnicas, prevenir lesiones, evitando movimientos exagerados y generando la confianza motivacional en el deportista. Por ello se cree que no tener esa capacitación facilita desarrollo de lesiones.

Entrevistado 1: "*El hecho de no tener un buen entrenador puede afectarnos, ya que las personas van a hacer lo que ellos creen que está bien*".

Entrevistado 4: "*Creo que se podría presentar de la misma manera en cualquier otro deporte, ya que, si no se realiza bajo supervisión, digamos de alguien un profesional, alguien que te explicando, que esté pendiente de lo que estás haciendo no vas a tener problemas con lesiones*".

Inadecuada técnica

Cuando se realiza el ejercicio sin tener en cuenta las técnicas deportivas o el gesto deportivo adecuado, hay una mayor probabilidad de lesión y disminución del rendimiento deportivo, es por esto que los deportistas recalcan la importancia de prestar atención al entrenador, más cuando se es principiante en la práctica.

Entrevistado 1: "*Se puede presentar si uno no tiene buena técnica, si no entiende bien la explicación del coach del entrenador, si no realiza los movimientos correctamente puede llevar a una lesión*".

Entrevistado 3: "*Puede ser muy fácil para una persona amateur, ya que pues no cuenta con las mismas condiciones técnicas que una persona que lleve más tiempo*".

Barreras para las lesiones musculoesqueléticas por la práctica de CF

Las barreras para las lesiones musculoesqueléticas son mecanismos que son utilizados para evitar o disminuir esa probabilidad lesiva durante la práctica del CF, como son los elementos de protección deportivos, técnicas deportivas y ejercicios de prevención de lesiones.

Adecuada preparación previo a la práctica del CF

Para alcanzar los resultados esperados del deportista, en cuanto a los cambios físicos y mentales, evitando las lesiones los entrevistados, los entrevistados consideran que es necesario un proceso de preparación física anterior para la práctica del CF, considerando el estado previo del deportista.

Entrevistado 1: "*Muchas personas antes no han realizado actividad física y el hecho de cambiar de la noche a la mañana puede aumentar el riesgo de lesionarse*".

Entrevistado 3: "*Porque se aprende mucho más rápido cuando se está joven y la energía no es la misma que cuando ya uno está más grande*".

Contar con entrenadores bien preparados

Para enseñar y practicar eficazmente, el entrenador debe tener un profundo conocimiento del deporte, como una aptitud básica sobre ejecución correcta de la técnica para el deporte, este elemento es importante para reducir la frecuencia de lesiones en los deportistas.

Entrevistado 3: "*Por eso también debemos tener un buen*

entrenador para que mire toda la parte física antes de empezar a entrenar y prevenir lesiones".

Entrevistado 6: "*igual cuando uno comienza a entrenar si uno cuenta con un buen entrenador, se ven las preguntas iniciales que son hace cuanto no se hace deporte, qué deporte hacía, con qué frecuencia, ya dependiendo de eso el entrenador sabe hasta dónde te puede llevar, los ejercicios que te puede enseñar, qué peso te puede exigir, en la mayoría de sitios se ve esto*".

A continuación, en el siguiente cuadro se resumen los hallazgos de este trabajo, acerca de las creencias sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas asociadas a la práctica del CF y los elementos que le aportan desde la perspectiva de los deportistas sujetos de esta investigación (Figura 1).

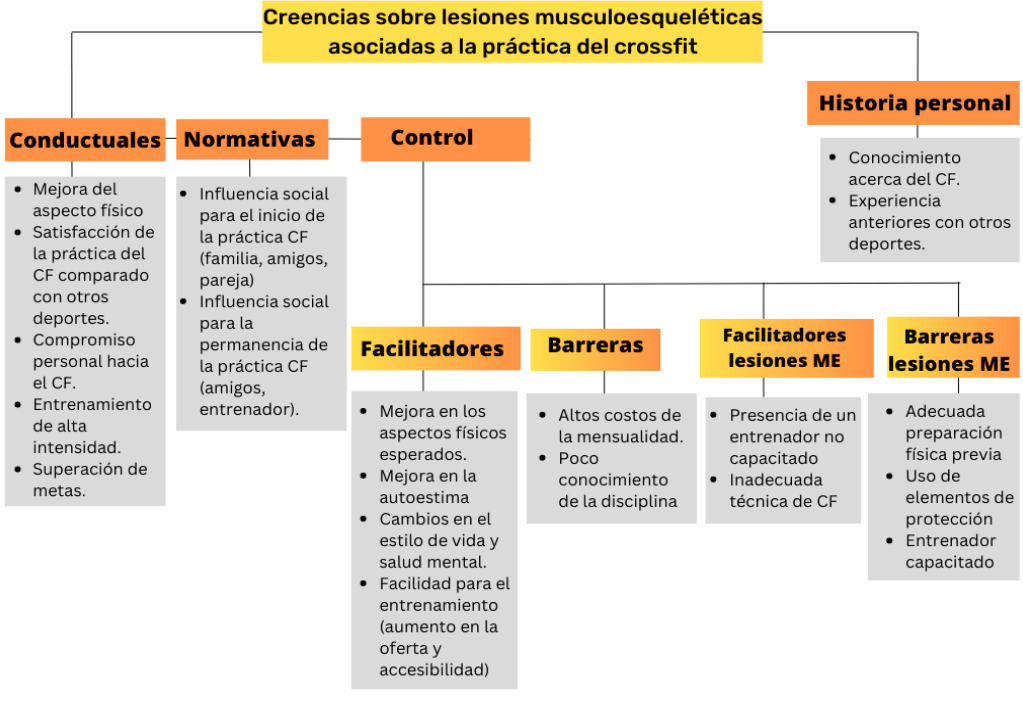
DISCUSIÓN

En cuanto a las características sociodemográficas y deportivas, todos los participantes fueron mayores de 21 años, 5 participantes de sexo masculino y 2 del sexo femenino, todos los participantes cursaron educación superior. Entre los deportistas, 5 de ellos practicaban 5 días a la semana, 4 participaron en competencias, y solo 3 tuvieron chequeos por fisioterapia. Lo anterior se contrasta con Almonte *et al*. (2020), en su estudio sobre CF, con un total de 10 participantes, 6 hombres y 4 mujeres, todos mayores de 21 años, con diferentes grados de escolaridad: grado asociado, bachillerato, maestría y doctorado. Todos los participantes entrenaron diariamente, 3 deportistas tuvieron participación en competencias y 8 de los 10 participantes recibieron servicios de fisioterapia (Almonte *et al.*, 2020), esto muestra una mayor adherencia a la práctica y mayor atención en los servicios preventivos como la fisioterapia, que en lo hallado en la presente investigación.

En cuanto a las creencias conductuales, los practicantes de CF reportaron satisfacción en los resultados físicos, la cual favorece su continuidad en la disciplina, estos hallazgos son similares a Anchustegui y Cruz, quienes reportaron beneficios con el CF como: perder peso, fortalecer y tonificar músculos. Los sujetos estudiados afirmaron que esos fueron sus objetivos a la hora de acudir a la disciplina, coincidiendo con el autor anterior, en que la apariencia y la imagen del cuerpo, fueron los propósitos primordiales para la práctica deportiva (Anchustegui y Cruz, 2019).

Este estudio señaló que el entrenamiento físico de alta intensidad y la superación de metas, se convierten en factores importantes para los practicantes de CF, lo que se apoya en los resultados de Almonte *et al*. (2020) quienes durante su observación encontraron que una característica en el CF, era el constante esfuerzo realizado por parte de los participantes, con el fin de mejorar su rendimiento físico, tanto para las personas con experiencia como sin ella.

Dentro de las creencias normativas, se encontró que los practicantes asocian su permanencia en la disciplina a la influencia social, ya que al estar rodeados por su círculo social cercano se sienten más en confort con la práctica. Como lo menciona Claudino, hay evidencia preliminar de un mayor sentido de comunidad, satisfacción y motivación entre los practicantes de CF. El realizar las sesiones de entrenamiento de forma grupal, se constituye en una estrategia de motivación para asegurar la adherencia a esta modalidad (Claudino *et al.,* 2018). Según Anchustegui y Cruz (2019), se denota el carácter humano y social de la práctica del CF, las personas entrevistadas no buscan únicamente la fuerza e intensidad que ofrece el entrenamiento, sino también las relaciones, hábitos en común e intercambio de conocimientos.



Fuente: Elaboración propia

Figura 1. Creencias sobre el riesgo de lesiones musculoesqueléticas.
Figure 1. Beliefs about the risk of musculoskeletal injuries.

Las creencias de control de este estudio fueron divididas en subcategorías, en cuanto a los facilitadores para la práctica de CF, los entrevistados sienten mayor autoestima y motivación por los resultados, cuando alcanzan cierto nivel en la disciplina. Esto concuerda con el estudio de Eather en jóvenes que practican CF, el cual reveló efectos positivos en las medidas de autopercepción física (apariencia percibida) (Eather *et al*., 2016). Sobre las barreras en la práctica, los entrevistados reportaron entre ellas el alto costo de la mensualidad y la falta de conocimiento del deporte. Lo contrario mostró un estudio en jóvenes universitarios, que halló como las principales barreras percibidas para los participantes: la falta de tiempo, la falta de energía y de voluntad (Rubio *et al*., 2016).

Dentro del análisis de las creencias de control, entre los facilitadores para las lesiones musculoesqueléticas derivadas del deporte se encontraron: las técnicas de ejecución inadecuadas, el personal no capacitado y el abandono por lesión grave. Según Zech, entre sus encuestados se creía que las lesiones por el CF se facilitaban por el contacto con otros jugadores, el cansancio y las características del ambiente (Zech y Wellmann, 2017). Diversos autores señalan otros factores de riesgo para las lesiones musculoesqueléticas relacionadas con el CF, por ejemplo Vassis, plantea la participación en competiciones, el tiempo de descanso semanal, la duración del entrenamiento, además de la frecuencia del entrenamiento por semana (Vassis *et al*., 2023), mientras que Lima añade el entrenamiento y la falta de atención por parte de fisioterapia (Lima *et al*., 2020); finalmente, Ángel menciona la falta de supervisión de un entrenador y la falta de experiencia en el deporte (Ángel *et al*., 2022) .

Entre los entrevistados, se encontró que se reduce la probabilidad de adquirir una lesión músculo esquelética contar con una buena preparación física, utilizar elementos de protección y el acompañamiento de un entrenador altamente capacitado. En la investigación de Bel, como medida preventiva de lesiones en basquetbolista se llevó a cabo un programa de entrenamiento en los últimos 24 meses, detallando que, entre las barreras protectoras para una lesión, está la realización de un programa adecuado prevención durante el tiempo que se practique el deporte (Bel *et al*., 2022), aspecto que no se encontró en hallazgos de esta investigación.

CONCLUSIONES

Las creencias conductuales de los participantes sobre el CF les permite mejoras físicas, comparando los resultados de la disciplina con otros deportes, esto genera un mayor compromiso hacia el deporte. En las creencias normativas, los deportistas se ven influenciados por terceros para iniciar y permanecer en la práctica de crossfit. En las creencias de control se encontraron facilitadores para la práctica del CF como son: las mejoras en el aspecto físico, la autoestima, la motivación en los resultados y el aumento de la accesibilidad a los sitios de CF. Dentro de las barreras para la práctica están: los altos costos de la mensualidad y el poco conocimiento que pueden llegar a tener sobre la disciplina.

En los facilitadores para las lesiones se asocian a tener un entrenador poco capacitado e inadecuada técnica. En las barreras de lesiones, los practicantes destacan la importancia de contar con una buena preparación física previa a la práctica del CF, usar los elementos de protección y contar con un entrenador capacitado. Por último, se confirma que los individuos toman decisiones con base a la evaluación de las ventajas, en este caso, los resultados positivos de la práctica del CF para seguir involucrados con la disciplina.

Durante el desarrollo de este estudio se enfrentaron limitaciones relacionadas con la muestra. Este estudio contó con fortalezas como investigar en un campo poco explorado, así mismo, da pie para futuras investigaciones sobre el tema. Con los resultados de este estudio se da un contraste en lo planteado por la teoría del comportamiento planificado, ya que los participantes se ven más influenciados por opiniones sociales para empezar con la práctica del CF.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tener conflictos de intereses en esta sección.

REFERENCIAS

Almonte, M., Fuentes, M., Emmanuelli, M., Conde, S. y Vélez, L. 2020. Vista de acercamiento de la fisioterapia al Crossfit: estudio etnográfico. Revista Iberoamericana de Ciencias de la Actividad Física y Deporte. 9(3): 1-17. Doi: 10.24310/riccafd.2020.v9i3.10108

Anchustegui, M. y Cruz, G. 2019. Prácticas corporales el auge: el crossfit. VI Jornadas de Investigación en Humanidades: homenaje a Cecilia Borel, Universidad Nacional del Sur. 11:687-693. Disponible en: https://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/handle/123456789/4993/Anchustegui%2c%20M.%20y%20Cruz%2c%20G.%20Pr%c3%a1cticas%20corporales%20en%20auge.%20El%20CrossFit.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ángel, M., García P., Terrados, N., Crespo, I., Del Valle M. y Olmedillas H. 2022. Injury in CrossFit®: A Systematic Review of Epidemiology and Risk Factors. Phys Sportsmed. 50(1):3-10. Doi: 10.1080/00913847.2020.1864675

Bel, L., Duc, M., Bizzini, M., Fournier, P.E. y Allet, L. 2022. Context of injury prevention strategies in Swiss basketball: survey of athletes, medical staff and coaches. BMJ Open Sport Exerc Med. 8(4): e001386. Doi: 10.1136/bmjsem-2022-001386

Gabbett, T., Bourgeois, F., Souza, H.S., Miranda, R.C., Mezêncio, B., Soncin, R., Cardoso F.C., Bottaro, M., Hernandez, A., Amadio, A. y Serrão, J. 2018. CrossFit overview: Systematic review and meta-analysis. Sports Med Open. 4(1): Doi:10.1186/s40798-018-0124-5

Declaración de Helsinki. Disponible en: https://www.wma.net/es/que-hacemos/etica-medica/declaracion-de-helsink/

Dominiski, F., Siqueira, T., Serefim, T. y Andrade, A. 2018. Perfil de lesoes em practicantes de Crossfit: Revision sistémica. Fisioter Pesqui. 25(2):229-239. Doi: 10.1590/1809-2950/17014825022018

Eather, N., Morgan, P. y Lubans, D. 2016. Effects of exercise on mental health outcomes in adolescents: Findings from the CrossFitTM teens randomized controlled trial. Psychol Sport Exer. 26:14-23. Doi: 10.1016/j.psychsport.2016.05.008

Feito, Y., Burrows, E. y Tabb, L. 2018. A 4-year analysis of the incidence of injuries among CF-trained participants. Orthopaedic Journal of Sports Medicine. 6(10): 2325967118803100. Doi: 10.1177/2325967118803100

Franco, V. y Pastrana, A. 2020. Creencias, conocimientos y prácticas saludables de los jóvenes deportistas del club barsky f.c. de Cajicá, Cundinamarca, Universidad de la sabana Disponible en: https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/43446/Tesis%20Valentina%20Franco%20y%20Alisson%20Pastrana.pdf?Sequence=1&isallowed=y

Lima, P., Souza, M., Sampaio, T., Almeida, G. y Oliveira, R. 2020. Epidemiology and associated factors for CrossFit-related musculoskeletal injuries: a cross-sectional study. The Journal of sports medicine and physical fitness, 60 (6): 889-894 . Doi: 10.23736/s0022-4707.20.10364-5.

Martínez, V. y Mux, L. 2018. Creencias de entrenadores marplatenses de futbol sobre las modalidades de afrontamiento del estrés de jóvenes deportistas. Disponible en: http://rpsico.mdp.edu.ar/handle/123456789/709

Meyer, J., Morrison, J. y Zuniga, J. 2017.The Benefits and Risks of CrossFit t: A Systematic Review. Workplace Health & Safety. 65(12): 612-618. Doi: 10.1177/216507991668556

Oviedo, I. y López, M. 2020. Una aproximación a lo cualitativo: identificando las creencias de la compartición de conocimiento en las comunidades de práctica. Estudios de la gestión: Revista Internacional de Administración.7: 19-42. Doi: 10.32719/25506641.2020.7.1

Queiroz, P., Santos da Costa, T., Da Cunha, R., Hespanhol, L., Pochini, A., Ramos L. y Cohen M. 2020. CrossFit and the Epidemiology of Musculoskeletal Injuries: A Prospective 12-Week Cohort Study. Orthopaedic Journal of Sports Medicine. 8(3): 2325967120908884. Doi:10.1177/2325967120908884

República de Colombia. 2012. Ley 1581 por la cual se dictan disposiciones generales para la protección de datos personales. Octubre 17 2012. Diario Oficial: 48587

Rizeanu, E. y Cordun, M. 2019. Impulsivity and irrational beliefs of injured basketball players. Physical Education, Sport and Kinetotherapy Journal. 58:13 Disponible en: https://discobolulunefs.ro/media/Discobolul%20No.%2058%20-%20December%202019.pdf#page=12

Rubio, R. y Varela, M. 2016. Barreras percibidas en jóvenes universitarios para realizar actividad física. Rev Cubana Salud Pública. 42(1): 61-69. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662016000100007&lng=es

Solis, C. 2015. Creencias sobre enseñanza y aprendizaje en docentes universitarios: Revisión de algunos estudios. Propos represent. 3(2):227–60. Doi: 10.20511/pyr2015.v3n2.83

Tafuri, S., Salatino, G., Napoletano, P., Monno, A. y Notarnicola, A. 2019. The risk of injuries among CF athletes: An Italian observational retrospective survey. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness. 59(9). Doi: 10.23736/s0022-4707.18.09240-x

Vassis, K., Siouras A., Kourkoulis, N.N., Poulis, I., Meletiou, G., Iliopoulou, A. y Misiris, I. 2023. Epidemiological profile among Greek CrossFit practitioners. Int J Environ Res Public Health. 20(3):2538. Doi: 10.3390/ijerph20032538.

Zech, A. y Wellmann, K. 2017. Perceptions of football players regarding injury risk factors and prevention strategies. PLoS Uno. 12(5): e0176829. Doi: 10.1371/journal.pone.0176829. eCollection 2017

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo original

Concentración de estevióside y rebaudiósido-a en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en interacción con micorrizas arbusculares y fósforo

Concentration of stevioside and rebaudioside-a in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants in interaction with arbuscular mycorrhizae and phosphorus

Rodrigo Armando Cauich-Cauich[1], Emanuel Hernández-Núñez[2], Mónica Guadalupe Lozano-Contreras[3]*✉, José María Tun-Suárez[1], Hugo Pilotzi-Xahuentitla[4], Rubén Humberto Andueza-Noh[1], Carlos Juan Alvarado-López[1]

[1] División de estudios de posgrado e investigación. Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, Yucatán, México.
[2] Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní. Calkiní, Campeche, México.
[3] Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Mocochá, Yucatán, México.
[4] Centro de Química del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Mexico.

RESUMEN

Stevia rebaudiana produce glucósidos de esteviol en sus hojas, el estevióside y rebaudiósido-A son los más importes gracias a su propiedad edulcorante. El fósforo es un elemento esencial en la biosíntesis de glucósidos de esteviol y las micorrizas arbusculares son capaces de promover la concentración de glucósidos por facilitar la traslocación de fósforo hacia la planta. Por tanto, se cuantificó la concentración de estevióside y rebaudiósido-A por medio de ^{1}H-RMN en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con consorcios de micorrizas arbusculares (consorcios RC, TZ y CY) y fertilizadas con niveles de fósforo (25, 50, 75 y 100 %). Se obtuvo un 76 % de colonización micorrícica con el tratamiento RC + 25 % fósforo, donde también se registró mayor contenido de fósforo foliar y mayor concentración de estevióside y rebaudiósido-A en mg g^{-1} de hoja seca, superando significativamente a la fertilización convencional. Con esta combinación se logró mejorar el rendimiento de estevióside y rebaudiósido-A en hojas de *S. rebaudiana*. Además, se destaca que el método ^{1}H-RMN se utilizó como una alternativa viable a la HPLC para cuantificar los principales glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*, el cual proporciona resultados cuantitativos en menos tiempo y con la misma precisión.

Palabras clave: metabolitos; glucósidos; HMA; fosfato; cuantificación.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana produces steviol glycosides in its leaves, with stevioside and rebaudioside-A as the most important due to their sweetening property. Phosphorus is an essential element in the biosynthesis of steviol glycosides, and arbuscular mycorrhizae can promote the concentration of glycosides by facilitating the translocation of phosphorus to the plant. Therefore, the concentration of stevioside and rebaudioside-A was quantified by means of ^{1}H-NMR, in *S. rebaudiana* plants inoculated with arbuscular mycorrhizal consortia (RC, TZ and CY consortia) and fertilized with phosphorus levels (25, 50, 75 and 100 %). A 76 % mycorrhizal colonization was obtained with the RC + 25 % phosphorus treatment, where a higher leaf phosphorus content and a higher concentration of stevioside and rebaudioside-A in mg g^{-1} of dry leaf were also recorded, significantly surpassing conventional fertilization. With this combination, it was possible to improve the yield of stevioside and rebaudioside-A in *S. rebaudiana* leaves. Furthermore, it is highlighted that the ^{1}H-NMR method was used as a viable alternative to HPLC to quantify the main steviol glycosides in *S. rebaudiana*, which provides quantitative results in less time and with the same precision.

Keywords: metabolites; glycosides; AM; phosphate; quantification.

INTRODUCCIÓN

El estevióside (Stv) y rebaudiósido-A (Reb-A) son los metabolitos secundarios de mayor importancia en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), se clasifican como glucósidos diterpénicos y son responsables de la propiedad edulcorante en las hojas y extractos derivados de las mismas (Brandle y Telmer, 2007; Libik-Konieczny *et al*., 2021), la particularidad de estos glucósidos es que pueden alcanzar una dulzura entre 143 y 320 veces mayor a la sacarosa y son libres de calorías, por tanto, no causan efectos secundarios dañinos en el cuerpo humano (Perrier *et al*., 2018; Libik-Konieczny *et al*., 2021). Actualmente, el Stv y Reb-A presentan alta demanda en países con problemas de salud pública como diabetes y obesidad por tratarse de edulcorantes naturales que sustituyen al azúcar y a edulcorantes sintéticos (Marcinek y Krejpcio, 2016; Ahmad *et al*., 2020). Con el fin de aumentar la concentración de Stv y Reb-A en el cultivo de *S. rebaudiana*, los estudios se han centrado en gran medida en la biomasa total producida (Mamta *et al*., 2010; Mandal *et al*., 2013), sin embargo, para mejorar la productividad en términos de metabolitos secundarios, se está impulsando la aplicación de agrotecnologías como la gestión del fotoperiodo (Alvarado-Orea *et al*., 2020; Rivera-Avilez *et al*., 2021), cultivo de tejidos (Aguilar-Jiménez *et al*., 2019; Sharma *et al*., 2023), uso de al-

*Autor para correspondencia: Mónica Guadalupe Lozano-Contreras
Correo-e: lozano.monica@inifap.gob.mx
Recibido: 19 de marzo de 2024
Aceptado: 13 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2280

coholes y sales (Gupta *et al*., 2014) y gestión del estrés hídrico (Fronza y Folegatti, 2003; Karimi *et al*., 2019). No obstante, es indispensable explorar en la manipulación de macronutrientes como el fósforo (P) que son indispensables en los procesos de biosíntesis de compuestos de interés (Maniruzzaman *et al*., 2017; Libik-Konieczny *et al*., 2021).

Es necesario identificar los principales factores que afectan la concentración de Stv y Reb-A, la eficiencia en la traslocación de P en la planta es clave para mejorar la producción de metabolitos (Tavarini *et al*., 2018). Además, se conoce ampliamente que las micorrizas translocan P del suelo a las plantas y favorecen su crecimiento, asimismo, pueden mejorar la producción de metabolitos secundarios como resultado de una mejor absorción de agua y nutrientes por la planta (Sbrana *et al*., 2014; Sarmiento-López *et al*., 2020), no obstante, la nutrición mejorada con P es probablemente el beneficio más conocido y documentado de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) para las plantas (Zimmerman *et al*., 2009; Bagyaraj *et al*., 2015; Gao *et al*., 2020; Higo *et al*., 2020). El efecto beneficioso de los HMA se atribuye a una extensa red micelial capaz de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de las raíces (Roy-Bolduc y Hijri, 2011; Spatafora *et al*., 2016;). También se sabe que los consorcios de HMA nativos suelen ser más efectivos que los productos a base de especies exóticas o una sola especie, debido a que los HMA se adaptan a ciertas condiciones ambientales específicas y su introducción en diferentes ambientes puede causar desbalance al medio (Lima *et al*., 2015).

Por otra parte, en el campo del análisis, el enfoque más popular para la cuantificación de Stv y Reb-A es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), este método se basa en la separación y cuantificación de los glucósidos, sin embargo, tiene limitaciones como la necesidad de compuestos estándar, tiempos de análisis relativamente largos y reproducibilidad deficiente a medida que el rendimiento de la columna empeora con el tiempo. A diferencia de los métodos basados en cromatografía, la resonancia magnética nuclear (^{1}H-RMN) ha demostrado ser una herramienta rápida y eficiente para cuantificar los glucósidos de esteviol en hojas de *S. rebaudiana* (Tangpaisarnkul *et al*., 2018).

La ^{1}H-RMN se basa directamente en los átomos (espines nucleares) de las moléculas, por lo que tiene, en principio, capacidad cuantitativa y se puede aplicar al análisis de cuantificación. Además, representa un enfoque completamente diferente que no depende de la separación de analitos y es considerada como una alternativa factible al HPLC, ya que permite un análisis significativamente más rápido y con una excelente reproducibilidad y robustez (Pieri *et al*., 2011). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue cuantificar mediante H^1 RMN el contenido de Stv y Reb-A en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con consorcios de HMA en interacción con niveles de P.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones experimentales

Se trasplantaron a nivel invernadero plantines de *S. rebaudiana* Bert. variedad Morita II de 15 cm aproximadamente, provenientes del INIFAP-C.E. Uxmal, Yucatán, México. Los consorcios de HMA evaluados provenían de localidades diferentes del estado de Yucatán y se determinaron como 1) RC; proveniente de Reserva Cuxtal (integrado por *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglomus claroideum*, *Glomus ambisporum*), 2) TZ; proveniente de Tizimín (Integrado por *Gigaspora* spp. y *Glomus* spp.) y CY; Colonia Yucatán (integrado por *Funneliformis* spp., *Glomus* spp. y *Ambispora* spp.). Los tres consorcios fueron extraídos por Cauich-Cauich *et al*. (2023). Los tratamientos (RC, TZ, CY y el control) se aplicaron directamente en el sustrato en concentración de 110 esporas. Los niveles de P evaluados fueron 0, 25, 50, 75 y 100 % suministrado como; 0, 79, 158, 237 y 316 mg de P_2O_5 kg^{-1} suelo respectivamente, con base en la fertilización convencional (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2017). Se utilizó sustrato estéril compuesto de suelo y bagazo de henequén en proporción 2:1 v/v y bolsas negras de poliestireno de 25 x 25 cm. Se aplicó riego por goteo con el 80 % de la ETo (Cauich-Cauich *et al*., 2018). Las temperaturas promedio registradas fueron 39 °C máxima y 24 °C mínima.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar donde se distribuyeron 20 tratamientos con 4 repeticiones que resultaron de la combinación de RC, TZ, CY, Control y 0, 25, 50, 75 y 100 % de P.

Colonización micorrícica total

Al final del experimento se estimó el porcentaje de colonización, para ello, las raíces se tiñeron siguiendo la técnica de Phillips y Hayman (1970). La colonización micorrícica total se calculó según el método de intersección de líneas (Giovannetti y Mosse, 1980). Se evaluaron 100 segmentos de raíces de cinco plantas para cada tratamiento.

Fósforo foliar

El contenido de P a nivel foliar de se realizó al final del experimento mediante µ-Fluorescencia de Rayos X (µ-XRF), con las metodologías descritas por Chí-Sánchez *et al*. (2021) en un equipo M4Tornado 100 (Bruker, Alemania). El haz colimador fue de 2 mm, el tubo de rayos X fue operado a 50kV y 200 µA y con un área sensible de 30 mm^2. Se cuantificó P en g kg^{-1} de materia seca. Las mediciones fueron realizadas al vacío a 20 mbar directamente a los porta muestras que contenían hoja seca y molida.

Preparación de muestras para ^{1}H-RMN

Las hojas de *S. rebaudiana* se secaron en una estufa de aire forzado a 70 °C hasta peso constante y se pulverizaron en un molino de laboratorio SV-MO-300T. Posteriormente, se liofilizaron para eliminar la humedad residual. Por cada repetición se tomaron 50 mg de muestra molida y se le colocó 1 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) (Sigma-Aldrich 99.9 atom %) como disolvente de grado espectroscópico con desplazamiento químico (δ) de 2.5, se adicionó 5 mg mL^{-1} de nicotinamida como referencia interna con δ de 7.5, 8.0,

8.5, 8.9, la cual se utiliza ampliamente y es aceptable como patrón de referencia (Dona *et al*., 2016). Posteriormente, se homogeneizo la solución por sonificación durante 60 minutos y se filtró para separar los residuos y partículas grandes.

Análisis por ^{1}H-RMN

Los espectros se registraron en un espectrómetro Varian 600 MHz AR Premium Compact (Santa Clara, California U.S.) utilizando las siguientes condiciones experimentales: tiempo de adquisición: 2.73 s, retardo de relajación: 1 s, número de transientes: 32, recopilados en 64k puntos de datos, número de puntos de la adquisición: 28,846 y 4 bloques de barrido (Biswapriya *et al*., 2019). Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova, incluyendo ajuste de fase manual, ajuste exponencial con LB: 0.3 Hz, corrección de línea base automática y referencia con respecto a la nicotinamida (7.5, 8.0, 8.5, 8.9 ppm). Se eliminaron las señales relacionadas con la saturación de la resonancia del agua con δ 3.4 y se integraron las regiones bajo las señales seleccionadas, normalizando la integración respecto a la señal de la nicotinamida. Los espectros ^{1}H-RMN de las muestras se registraron con parámetros constantes para garantizar la precisión de los resultados.

Análisis cuantitativo de Stv y Reb-A

La aplicación de ^{1}H-RMN cuantitativa requiere que al menos una señal no superpuesta para que cada molécula a cuantificar esté disponible para la integración, conocer el número de hidrógenos o núcleos que proyectan la señal y la concentración de la referencia. La cuantificación se realizó según Malz y Jancke (2005) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Cm = \frac{Href\ Cref\ Im}{Hm\ Iref}$$

Donde:

C*m*= Concentración en la muestra (mg mL^{-1}).
H*ref*= Número de hidrógenos (protones) de la referencia.
I*ref*= Intensidad de la señal (integral) de la referencia.
C*ref*= Concentración de la referencia (mg mL^{-1}).
H*m*= Número de hidrógenos (protones) de la muestra.
I*m*= Intensidad de la señal (integral) de la muestra.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en porcentaje se transformaron para homogeneizar varianzas mediante la función arco seno, con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza y se aplicó como comparador de medias el método de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Universidad Nacional de Córdova, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de colonización micorrícica total

El mayor porcentaje de colonización se obtuvo en el tratamiento RC+0 %P, seguido de RC+25 %P con 80 y 76 % respectivamente. Mientras mayor fue la cantidad de P aplicado, el porcentaje de colonización disminuyó. Es decir, se vio afectado con dosis altas de P, lo que sugiere que, a niveles altos de P en la rizosfera, la simbiosis micorrícica se interrumpe y se vuelve irrelevante para las plantas (Smith *et al*., 2011). Por tanto, la cantidad de P considerado en el plan de fertilización puede limitar el efecto de HMA en plantas inoculadas.

Contenido de fósforo foliar

La inoculación de los consorcios RC y CY permitió un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en el contenido de P a nivel foliar en *S. rebaudiana*. Los tratamientos RC+25 %P y CY+25 %P estimularon la mayor acumulación de P en las hojas con 1.39 y 1.34 g kg^{-1} de materia seca respectivamente, superando al control (control + 25 %P) en un 89 % (Tabla 1).

En plantas sin micorriza el contenido de P foliar mostró un comportamiento directamente proporcional al P adicionado, es decir, mientras mayor fue la dosis de P, hubo mayor contenido de P en las hojas. Por el contrario, en plantas micorrizadas se observó una tendencia diferente, a medida que aumentó la dosis de P adicionado, el contenido de P foliar disminuyó, esta respuesta puede atribuirse a la disminución del porcentaje de colonización observada en esta condición, lo que afectó la respuesta de la micorrización.

Tabla 1. Efecto de la inoculación de consorcios de HMA nativos y diferentes concentraciones de P_2O_5 en el contenido de fósforo en hojas *S. rebaudiana*.
Table 1. Effect of native HMA consortia inoculation and different P_2O_5 concentrations in phosphorous content in *S. rebaudiana* leaves.

Contenido (g kg materia seca)	P adicionado (%)	Consorcios de HMA				Media
		RC	TZ	CY	Control	
P	0	0.41 ± 0.05 c	0.54 ± 0.11 bc	0.37 ± 0.07 c	0.08 ± 0.01 f	0.35 D
	25	1.39 ± 0.20 a	0.79 ± 0.10 b	1.34 ± 0.21 a	0.15 ± 0.03 d	0.92 A
	50	1.12 ± 0.18 a	0.65 ± 0.13 b	0.97 ± 0.17 ab	0.24 ± 0.02 e	0.75 A
	75	0.81 ± 0.03 b	0.71 ± 0.09 b	0.64 ± 0.09 b	0.36 ± 0.09 c	0.63 AB
	100	0.53 ± 0.07 bc	0.47 ± 0.06 bc	0.52 ± 0.01 bc	0.35 ± 0.04 c	0.47 C
Media		0.85 A	0.63 B	0.77 A	0.24 C	
Significancia: HMAxP= **; HMA= **; P= **						

Medias (n= 4) ± desviación estándar. Letras minúsculas indican el efecto de la interacción HMA*P. Letras mayúsculas en la fila indican el efecto de consorcios HMA. Letras mayúsculas en la columna indican el efecto de niveles de fósforo. La significancia se indica como: **: significativo a $P \leq 0.01$.

Los consorcios HMA tuvieron efectos significativos en el contenido de P foliar. Se obtuvieron aumentos considerando la sola inoculación de los HMA en comparación a plantas no inoculadas. No obstante, el consorcio TZ mostró menor desempeño en los resultados, esto sugiere que, probablemente, las especies que lo integran no tienen afinidad en la traslocación de P en plantas de *S. rebaudiana* como lo tendrían en otras variables u especies vegetales. Es importante tener en cuenta que las especies de HMA pueden tener diferentes tipos de interacción con las plantas, y esta condición se puede ver reflejado en su efectividad (Eun-Hwa *et al*., 2013).

El efecto sinérgico de RC+25 %P y CY+25 %P superó a la fertilización convencional. Estos resultados van de acuerdo con el estudio previo realizado por Mandal *et al*. (2015), quienes observaron aumentos hasta del 56 % en el contenido de P en plantas micorrizadas en comparación a plantas control. Por su parte, Tavarini *et al*. (2018) informaron que en plantas micorrizadas de *S. rebaudiana* el contenido de P foliar fue significativamente más alto cuando se aplicaron dosis bajas de P (25 mg de P_2O_5 kg^{-1} suelo).

La eficiencia de los consorcios RC y CY en la traslocación de P aumentó cuando los niveles de P aplicado en el suelo fueron menores a 158 mg de P_2O_5 kg^{-1} suelo, sin embargo, además de un adecuado nivel de P, también influye la afinidad con la que las especies que conforman el consorcio capturan P en el suelo, incluso cuando sea escaso (Smith *et al*., 2011; Jansa *et al*., 2019). Este sentido, este resultado puede atribuirse a que los géneros *Funneliformis* y *Glomus* spp. presentes en los consorcios RC y CY han sobresalido en otros estudios por su afinidad en la toma de P (Hoseini *et al*., 2015; Sahodaran *et al*., 2019). El consorcio TZ no tuvo efectos significativos, lo que supone, que las especies que lo integran no tienen afinidad sobre esta variable.

Los resultados son consistentes con el papel conocido de los HMA en la nutrición de las plantas, el aumento en el contenido de P foliar por efecto de la simbiosis micorrícica también se asocia principalmente a la actividad de las hifas extraradicales que proporcionan una vía adicional para la captación de P (Ezawa y Saito, 2018).

Intensidad de señales Stv y Reb-A en espectro ^{1}H-RMN

Se adquirieron 80 espectros, en cada uno se identificó la señal del disolvente DMSO-d_6 (δ 2.5 ppm), y se integraron las señales de referencia interna (nicotinamida) (δ 7.5, 8.0, 8.5, 8.9 ppm), así como, las señales del Stv y Reb-A. La identificación correcta de las señales en los espectros fue respaldada con los estándares (ver información de soporte). En la figura 1 se observa un espectro ^{1}H-RMN representativo de las muestras procesadas de *S. rebaudiana***.**

Cuantificación

La interacción entre los consorcios de HMA y niveles de P tuvo efectos significativos ($P \leq 0.05$) en la concentración de Stv y Reb-A. El tratamiento RC+25 %P mejoró la concentración tanto de Stv como de Reb-A en comparación al control, generando 9.76 y 33.46 mg g^{-1} de hoja seca respectivamente (Tabla 2), lo que fue consistente con la respuesta del mismo tratamiento en el contenido de P foliar. En plantas micorrizadas por RC, mientras mayor fue el nivel de P adicionado, menor fue la concentración de Stv. Por su parte, el efecto de los consorcios TZ y CY no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con respecto al control en la concentración de Stv, este resultado se vio reflejado en un bajo coeficiente de correlación entre el porcentaje de colonización y la concentración de Stv y Reb-A ($r = 0.09$ y $r = 0.5$ para Stv y Reb-A respectivamente (figura 2).

La concentración de Reb-A se vio mejorada en los tratamientos TZ y CY (22.43 y 22.53 mg g^{-1} de hoja seca respectivamente) en comparación al control, sin embargo, este resultado no superó la concentración que generó RC+25 %P, el cual superó en un 63 % a la fertilización convencional en la concentración de ambos glucósidos. En el presente estudio

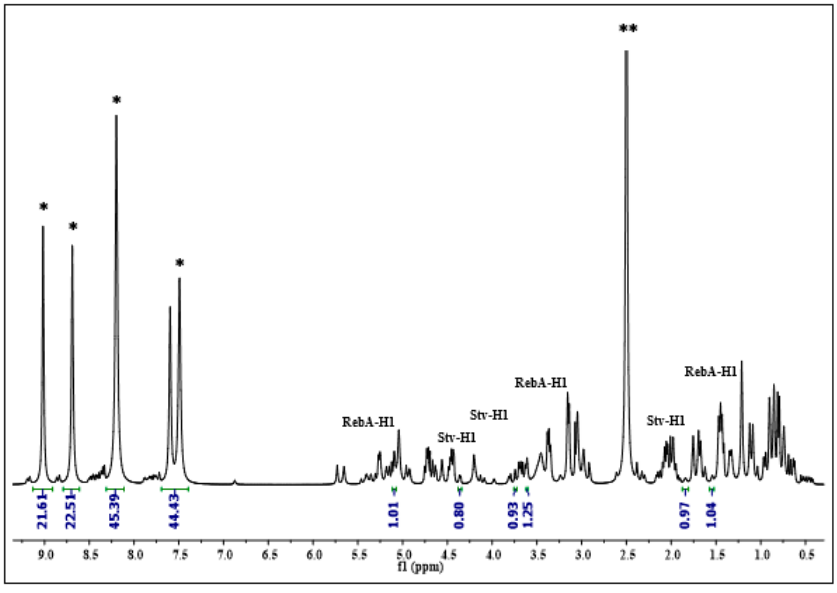


Figura 1. Espectro ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) representativo de las muestras de *S. rebaudiana* mostrando las señales seleccionadas e integradas correspondientes a esteviósido (Stv-H1) y rebaudiósido-A (RebA-H1) para su cuantificación. **señal de DMSO-d_6, *señales integradas de la referencia (nicotinamida).

Figure 1. ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) spectra representative of samples from *S. rebaudiana* showing selected and integrated signals corresponding to stevioside (Stv-H1) and rebaudioside-A (RebA-H1) por quantification. ** DMSO-d_6 signal, * reference (nicotinamide) integrated signal.

Tabla 2. Efecto de la inoculación de consorcios nativos de HMA y fertilización con fósforo en el contenido de esteviósido y rebaudiósido-A en hojas de *S. rebaudiana* Bert.
Table 2. Effect of native HMA consortia inoculation and phosphorous fertilization in stevioside and rebaudioside-A contents, in *S. rebaudiana* Bert leaves.

Glucósido (mg g^{-1} hoja seca)	P adicionado (%)	Consorcios de HMA RC	TZ	CY	Control	Media
	0	7.29 ± 0.44 b	5.60 ± 0.88 bc	5.74 ± 0.26 c	4.68 ± 1.29 c	5.83 A
	25	9.76 ± 0.87 a	5.77 ± 1.02 bc	5.87 ± 0.51 bc	5.31 ± 0.53 c	6.68 A
Stv	50	8.07 ± 0.53 b	6.91 ± 0.72 b	5.70 ± 0.53 bc	6.61 ± 0.76 bc	6.82 A
	75	4.77 ± 0.52 cd	5.86 ± 0.60 bc	3.50 ± 0.17 ce	6.26 ± 0.83 bc	5.10 AB
	100	5.75 ± 0.91 bc	5.19 ± 0.39 c	5.63 ± 1.11 bc	6.24 ± 0.85 bc	5.70 AB
Media		7.13 A	5.87 B	5.29 B	5.82 B	
Significancia: HMAxP= *; HMA= **; P= ns						
	0	22.00 ± 1.30 c	18.38 ± 1.50 cd	19.73 ± 0.76 cd	14.18 ± 1.40 e	18.57 D
	25	33.46 ± 4.41 a	25.75 ± 0.74 b	27.38 ± 1.25 b	18.08 ± 2.47 cd	26.16 A
Reb-A	50	24.91 ± 1.21 b	18.54 ± 1.96 cd	20.60 ± 1.29 c	18.27 ± 2.12 cd	20.58 C
	75	22.15 ± 2.15 bc	26.33 ± 0.72 b	22.84 ± 1.00 bc	17.97 ± 0.72 d	22.32 B
	100	23.75 ± 0.92 bc	23.17 ± 1.38 bc	22.10 ± 1.61 c	21.38 ± 1.15 c	22.60 B
Media		25.25 A	22.43 B	22.53 B	17.98 C	
Significancia: HMAxP= **; HMA= **; P= *						

Medias (n = 4) ± DE. Letras minúsculas indican el efecto de la interacción HMA*P. Letras mayúsculas en la fila indican el efecto de consorcios HMA. Letras mayúsculas en la columna indican el efecto de niveles de fósforo. La significancia se indica como: ns: no significativo, *: significativo a P ≤ 0.05, **: significativo a P ≤ 0.01.

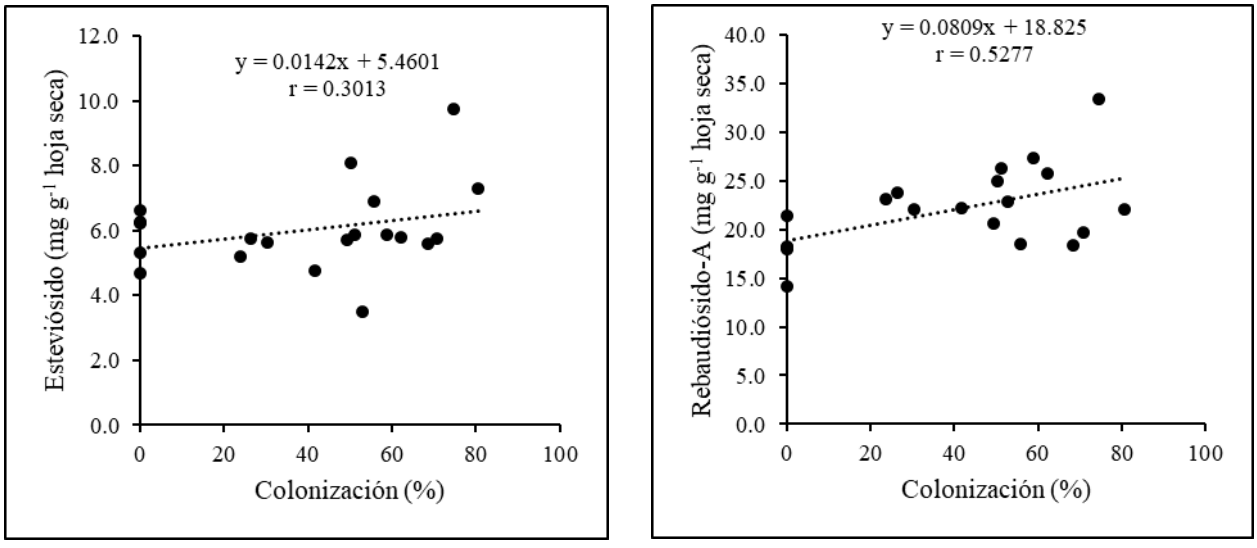


Figura 2. Correlación lineal positiva entre el porcentaje de colonización micorrícica y el contenido de A) esteviósido y B) rebaudiósido-A en plantas de *S. rebaudiana.*
Figure 2. Positive linear correlation between microrricic colonization percentage and contents of A) stevioside and B) reboudioside-A in *S. rebaudiana* plants.

es evidente el efecto benéfico del consorcio RC, que en combinación con 25 %P permitió aumentar 63 % el rendimiento tanto de Stv como de Reb-A, lo que indica que, aportes mayores al 25 %P en la fertilización de plantas micorrizadas no siempre conlleva a un aumento en la concentración de glucósidos en *S. rebaudiana*. Este resultado se atribuye a que el mismo tratamiento mejoró el contenido de P foliar. A pesar de ello, esta observación no puede atribuirse a una dosis específica de P en plantas micorrícicas. Roy-Bolduc y Hijri (2011) afirman que la absorción de otros nutrientes por micorrización puede causar una disminución en la concentración de P debido a la dilución interna en la planta. Sin embargo, en este estudio, se obtuvo en general una correlación lineal positiva entre el contenido de fósforo a nivel foliar y el contenido de Stv y Reb-A en las hojas de *S. rebaudiana*, mostrando un coeficiente de correlación de r = 0.4 y r = 0.8 para Stv y Reb-A respectivamente, como se observa en la figura 3.

El consorcio CY también optimizó el contenido de P foliar cuando se combinó con 25 %P, sin embargo, este beneficio no se vio reflejado en la concentración de Stv. Por tanto, el aumento en la producción de metabolitos secundarios por HMA podría estar relacionado tanto por mecanismos nutricionales como no nutricionales como lo menciona Zubek *et al*. (2012) y Mandal et al. (2013). Probablemente, el efecto

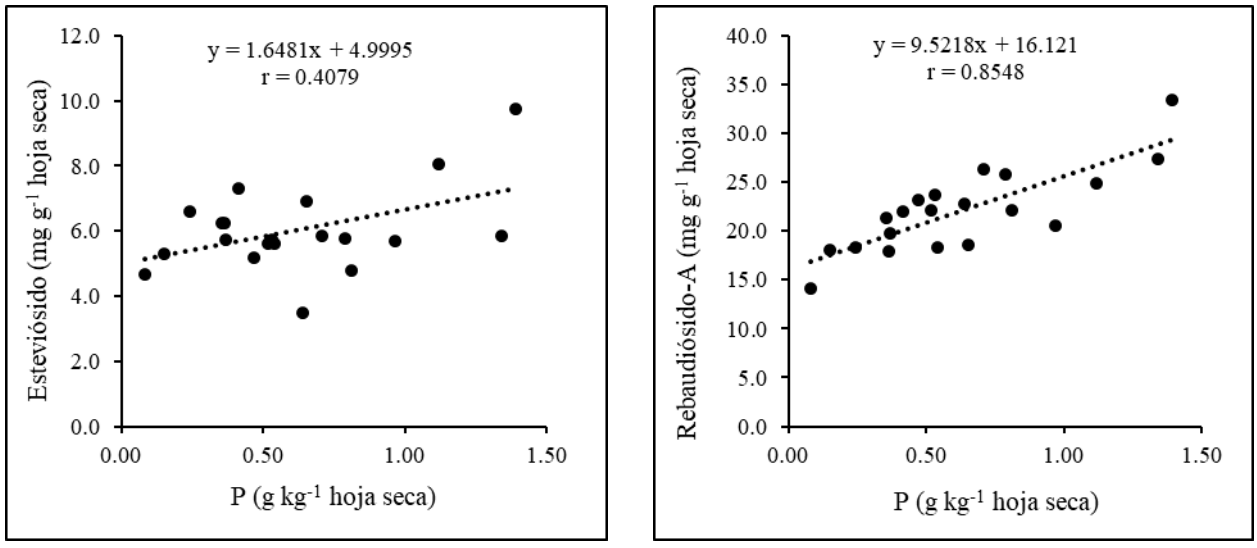


Figura 3. Correlación lineal positiva entre el contenido de fósforo foliar y el contenido de A) esteviósido y B) rebaudiósido-A en plantas de *S. rebaudiana*.
Figure 3. Positive linear correlation between foliar phosphorous content and A) stevioside and B) reboudioside-A contents in *S. rebaudiana* plants.

benéfico diferencial de las especies HMA que conforman el consorcio CY no tiene afinidad en la vía de glucosilación del Stv, lo que probablemente estaría relacionado con la regulación de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol. Es decir, las especies de HMA pueden influir de manera diferente en la productividad de las plantas. En este contexto, Sarmiento-López *et al*. (2021) obtuvieron menor acumulación de Reb-A en plantas inoculadas con Rhizophagus irregularis + 200 µM de fosfato monopotásico y, por el contrario, concentraciones superiores en plantas testigo con el mismo nivel de fertilización.

Los consorcios TZ y CY aumentaron la concentración de Reb-A cuando se combinaron con 25 y 75 % P, sin embargo, no optimizaron el contenido de Stv, esto sugiere que posiblemente la combinación de los consorcios influyó en la activación de genes clave que codifican glicosiltransferasas en el proceso de biosíntesis. Mohamed *et al*. (2011) mencionan que las glicosiltransferasas son específicas y transfieren moléculas de azúcar de un donante activo a una molécula aceptora. Por lo tanto, la concentración de azúcar influye en la formación de cada glucósido en las hojas de *S. rebaudiana* (Samsulrizal *et al*., 2019).

Por otra parte, la concentración de metabolitos secundarios en las plantas está en función de la variedad, el lugar del cultivo, la temporada, las condiciones de cultivo y la precisión del método analítico (Pieri *et al*., 2011). En México se ha reportado para *S. rebaudiana* variedad Morita II 2.18 % de Stv y 9.12 % de Reb-A (en proporción 1:8 veces) utilizando para el análisis cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Aranda-González *et al*., 2015). En este estudio, las concentraciones de Stv oscilaron entre 3.50 y 9.76 mg g^{-1} de hoja seca, y las de Reb-A entre 14.18 y 33.46 mg g^{-1} de hoja seca, utilizando para el análisis ^{1}H-RMN. En comparación a lo reportado anteriormente, se obtuvo alrededor de 2 veces más el contenido de Stv y Reb-A en plantas micorrizadas y fertilizadas con 25 %P. En otros estudios como el de Mandal et al. (2013) reportaron en India concentraciones de Stv y Reb-A entre 35 y 40 mg g^{-1} de hoja seca en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con una especie de HMA (*Rhizhophagus fasciculatus*) + 50 mg P_2O_5 kg^{-1} suelo, sin embargo, utilizaron la variedad Cimmeethi.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se hace énfasis de la utilización de consorcios HMA como una estrategia para eficientizar la traslocación de P en la planta y mejorar la concentración de Stv y Reb-A. Los resultados mostraron que las plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con el consorcio RC en combinación con 25 % P (con base en la dosis fertilización convencional) presentaron 76 % de colonización, mayor contenido de P a nivel foliar y se mejoró la concentración de Stv y Reb-A en comparación a las plantas fertilizadas de manera convencional. Esto indica que la nutrición vegetal, especialmente la fertilización con P en plantas micorrícicas optimiza y desempeña un papel importante en la biosíntesis de glucósidos de esteviol. Además, la aplicación del consorcio RC como biofertilizante, es válido para este cultivo, ya que mejora la concentración de Stv y Reb-A. Por otro lado, los consorcios TZ y CY solo optimizaron la concentración de Reb-A en comparación al control, esto puede explicarse por la interacción entre diferentes simbiontes presentes en cada consorcio, lo cual resulta en respuestas diferenciales en la producción de compuestos específicos. Adicionalmente, la ^{1}H-RMN permitió la cuantificación de los principales glucósidos de *S. rebaudiana* sin basarse en el uso de compuestos estándar y sin la necesidad de una calibración externa, esto da como resultado un análisis más rápido. La ^{1}H-RMN puede ser una alternativa factible al HPLC para la cuantificación de Stv y Reb-A en *S. rebaudiana*.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de posgrado. Al programa de Doctorado en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable del Tecnológico Nacional de México, campus Conkal y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento brindado para la realización del proyecto.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

Aguilar-Jiménez, D., Piña-Guillén, J. y Silva Díaz, V. 2019. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* y análisis preliminar de esteviósidos. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 10(1): 197-204. https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1543

Alvarado-Orea, I.V., Paniagua-Vega, D., Capataz-Tafur, J., Torres-López, A., Vera-Reyes, I., García-López, E. y Huerta-Heredia, A.A. 2020. Photoperiod and elicitors increase steviol glycosides, phenolics, and flavonoid contents in root cultures of *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 56: 298-306. https://doi.org/10.1007/s11627-019-10041-3

Aranda-González, I., Moguel-Ordoñez, Y. y Betancur-Ancona, D. 2015. Determination of rebaudioside A and Stevioside in leaves of *S. rebaudiana* Bertoni grown in México by a validated HPLC method. American journal of analytical chemistry. 6(11): 878. https://doi.org/10.4236/ajac.2015.611083

Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J. y Mahomoodally, M.F. 2020. *Stevia rebaudiana* Bertoni: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. Trends in Food Science & Technology. 100: 177-189. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.030

Bagyaraj, D.J., Sharma, M.P. y Maiti, D. 2015. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. Current Science. 1288-1293. https://www.jstor.org/stable/24905490

Biswapriya, B.M., Ruiz-Hernández, I.M., Hernández-Bolio, G.I., Hernández-Núñez, E., Díaz-Gamboa, R. y Colli-Dula, R.C. 2019. ^{1}H NMR metabolomic analysis of skin and blubber of bottlenose dolphins reveals a functional metabolic dichotomy. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 30: 25-32. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.02.004

Brandle, J.E. y Telmer, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry. 68(14): 1855-1863. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.010

Cauich Cauich, R., Pérez Gutiérrez, A., Lozano Contreras, M.G., Garruña, R. y Ruíz Sánchez, E. 2018. Productividad de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diferentes láminas de riego e inoculantes microbianos. Nova scientia. 10(20): 30-46. https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1166

Cauich-Cauich, R., Tun-Suárez, J. M., Cristóbal-Alejo, J., Hererra-Parra, E., Andueza-Noh, R., y Lozano-Contreras, M.G. 2023. Evaluación de consorcios micorrícicos arbusculares nativos en interacción con niveles de fósforo en la promoción del crecimiento y fotosíntesis de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biotecnia. 25(1): 67-80. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1765

Chí-Sánchez, F.A., Alvarado-López, C.J., Cristóbal-Alejo, J., González-Moreno, A. y Reyes-Ramírez, A. 2021. Mineral content of landraces maize from Yucatán: analysis by µ-Fluorescence X-ray. Terra Latinoamericana. 39. https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.454

Dona, A.C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E.A., Varshavi, D., Veselkov, K. y Everett, J.R. 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. Computational and structural biotechnology journal. 14: 135-153. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005

Eun-Hwa, L., Ju-Kyeong, E., Kang-Hyeon, K. y Ahn-Heum, E. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. Mycobiology. 41: 121-125. https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.3.121

Ezawa, T. y Saito, K. 2018. How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. New phytologist. 220(4): 1116-1121. https://doi.org/10.1111/nph.15187

Fronza, D. y Folegatti, M. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni crop estimated through microlysimeter. Scientia Agricola. 60(3): 595-599. https://doi.org/10.1590/S0103-90162003000300028

Gao, X., Guo, H., Zhang, Q., Guo, H., Zhang, L., Zhang, C. y Zeng, F. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhanced the growth, yield, fiber quality and phosphorus regulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Scientific Reports. 10(1): 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59180-3

Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New phytologist. 489-500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x

Gerdemann, J.W. y Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological society. 46(2): 235-244. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0

Gupta P., Sharma S. y Saxena S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na_2CO_3) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. Applied biochemistry and biotechnology. 172(6): 2894-2906. https://doi.org/10.1007/s12010-014-0736-2

Higo, M., Azuma, M., Kamiyoshihara, Y., Kanda, A., Tatewaki, Y. e Isobe, K. 2020. Impact of phosphorus fertilization on tomato growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities. Microorganisms. 8(2): 178. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020178

Hoseini, R., Mohammadi, E. y Kalatejari, S. 2015. Effect of bio-fertilizer on growth, development and nutrient content (leaf and soil) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Crop Protection. 4(5): 691-704. http://jcp.modares.ac.ir/article-3-2883-en.html

Jansa, J., Forczek, S.T., Rozmoš, M., Püschel, D., Bukovská, P. y Hršelová, H. 2019. Arbuscular mycorrhiza and soil organic nitrogen: network of players and interactions. Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 6(1): 1-10. https://doi.org/10.1186/s40538-019-0147-2

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Pompeiano, A. and Angelini, L.G. 2019. Plant growth retardants (PGRs) affect growth and secondary metabolite

biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under drought stress. South African Journal of Botany. 121: 394-401. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.028

Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Tuleja, M. y Konieczny, R. 2021. Synthesis and production of steviol glycosides: recent research trends and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 105(10): 3883-3900. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11306-x

Lima, C.S., Campos, M.A.d.S. y da Silva, F.S.B. 2015. Mycorrhizal Fungi (AMF) increase the content of biomolecules in leaves of *Inga vera* Willd. seedlings. Symbiosis. 65: 117-123. https://doi.org/10.1007/s13199-015-0325-3

Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Tuleja, M. y Konieczny, R. 2021. Synthesis and production of steviol glycosides: recent research trends and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 105(10): 3883-3900. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11306-x

Mandal, S., Upadhyay, S., Singh, V.P. y Kapoor, R. 2015. Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: a concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. Plant Physiology and Biochemistry. 89: 100-106. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.02.010

Mandal, S., Evelin, H., Giri, B., Singh, V.P. y Kapoor, R. 2013. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. Applied soil ecology. 72: 187-194. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.003.

Mamta, R.P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R.K. y Tewari, R. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevio-side and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Applied Soil Ecology. 46: 222-229. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.008

Maniruzzaman, M., Chowdhury, T., Rahman, M.A. y Chowdhury, M.A. H. 2017. Phosphorus use efficiency and critical P content of stevia grown in acid and non-calcareous soils of Bangladesh. Research in Agriculture Livestock and Fisheries. 4(2): 55-68. https://doi.org/10.3329/ralf.v4i2.33717

Marcinek, K. y Krejpcio, Z. 2016. *Stevia rebaudiana* Bertoni: health promoting properties and therapeutic applications. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 11(1): 3-8. https://doi.org/10.1007/s00003-015-0968-2

Malz, F. y Jancke, H. 2005. Validation of quantitative NMR. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 38(5): 813-823. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.043

Mohamed, A.A., Ceunen, S., Geuns, J.M., Van den Ende, W. y De Ley, M. 2011. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. Journal of plant physiology. 168(10): 1136-1141. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.030

Perrier, J.D., Mihalov, J.J. y Carlson, S.J. 2018. FDA regulatory approach to steviol glycosides. Food and Chemical Toxicology. 122: 132-142. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.062

Pieri, V., Belancic, A., Morales, S. y Stuppner, H. 2011. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ^{1}H NMR spectroscopy. Journal of agricultural and food chemistry. 59(9): 4378-4384. https://doi.org/10.1021/jf104922q

Phillips, J.M. y Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British mycological Society. 55(1): 158-161. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3

Ramírez-Jaramillo, G. y Lozano-Contreras, M.G. 2017. La producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Mexico. AgroProductividad. 10(8): 84-90. https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1080

Rivera-Avilez, J.A., Jarma-Orozco, A. y Pompelli, M.F. 2021. *Stevia rebaudiana* Bertoni: The interaction of night interruption on gas exchange, flowering delay, and steviol glycosides synthesis. Horticulturae. 7(12): 543. https://doi.org/10.3390/horticulturae7120543

Roy-Bolduc, A. y Hijri, M. 2011. The use of mycorrhizae to enhance phosphorus uptake: a way out the phosphorus crisis. Journal of Biofertilizers & Biopesticides. 2(104): 1-5. https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000104

Samsulrizal, N.H., Zainuddin, Z., Noh, A.L. y Sundram, T.C. 2019. A review of approaches in steviol glycosides synthesis. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 2(3): 145-157. https://doi.org/10.38001/ijlsb.577338

Sarmiento-López, L.G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L. y Rodríguez-Monroy, M. 2021. Arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* increases trichome development, flavonoid and phenolic compound accumulation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 31: 101889. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101889

Sarmiento-López, L.G., López-Meyer, M., Sepúlveda-Jiménez, G., Cárdenas, L. y Rodríguez-Monroy, M. 2020. Photosynthetic performance and stevioside concentration are improved by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* under different phosphate concentrations. PeerJ. 8: 1-23. https://doi.org/10.7717/peerj.10173

Sahodaran, N.K., Arun, A.K. y Ray, J.G. 2019. Native arbuscular mycorrhizal fungal isolates (*Funneliformis mosseae* and *Glomus microcarpum*) improve plant height and nutritional status of banana plants. Experimental Agriculture. 55(6): 924-933. https://doi.org/10.1017/S0014479719000036

Sieverding, E. 1990. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 29(1-4): 369-390. https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90303-U

Sbrana, C., Avio, L. y Giovannetti, M. 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. Electrophoresis. 35(11): 1535-1546. https://doi.org/10.1002/elps.201300568

Sharma, S., Gupta, S., Kumari, D., Kothari, S.L., Jain, R. y Kachhwaha, S. 2023. Exploring plant tissue culture and steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: A review. Agriculture. 13(2): 475. https://doi.org/10.3390/agriculture13020475

Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M. y Smith, F.A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. Plant physiology. 156(3): 1050-1057. https://doi.org/10.1104/pp.111.174581

Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L. y Stajich, J.E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. Mycologia. 108(5): 1028-1046. https://doi.org/10.3852/16-042

Tavarini, S., Passera, B., Martini, A., Avio, L., Sbrana, C., Giovannetti, M. y Angelini, L.G. 2018. Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. Industrial Crops and Products. 111: 899-907. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.055

Tangpaisarnkul, N., Tuchinda, P., Wilairat, P., Siripinyanond, A., Shiowattana, J. y Nobsathian, S. 2018. Development of pure certified reference material of stevioside. Food chemistry. 255:7 5-80. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.029

Zimmerman, E., St-Arnaud, M. y Hijri, M. 2009. Sustainable agriculture and the multigenomic model: how advances in the genetics of arbuscular mycorrhizal fungi will change soil management practices. In Molecular plant-microbe interactions. F. BKBNaD (ed.), pp. 269-287. CAB International., Oxfordshire, UK.

Zubek, S., Mielcarek, S. y Turnau, K. 2012. Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza. 22: 149-156. https://doi.org/10.1007/s00572-011-0391-1

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Se detectaron por ^{1}H-RMN las señales correspondientes al esteviósido (Stv) y rebaudiósido-A (Reb-A) para lo cual, se utilizaron los estándares comerciales: *stevioside hydrate* (98 %) y *rebaudioside A* (96 %) (Sigma-Aldrich). Los espectros de los estándares se superpusieron y se compararon para seleccionar aquellas señales que no mostraran traslape, con la finalidad de identificar la diferencia y particularidad de señales de cada glucósido (Stv y Reb-A). Ambos espectros se caracterizaron por mostrar tres grupos distintos de señales que corresponderían a los protones (H-1) de la aglicona y de los azúcares unidos de acuerdo con su estructura química.

En la figura soporte 1 se observan los tres grupos distintos de señales no traslapadas que mostraron los estándares Stv y Reb-A. En el caso del Stv, se seleccionaron las señales con desplazamiento químico (δ) a 4.37, 3.79 y 1.58 ppm (Figura soporte 2, imagen amplificada que corresponde a las flechas rojas), para el caso del Reb-A se integraron las señales con δ 5.12, 3.62 y 1.85 ppm (Figura soporte 3, imagen amplificada que corresponde a las flechas azules).

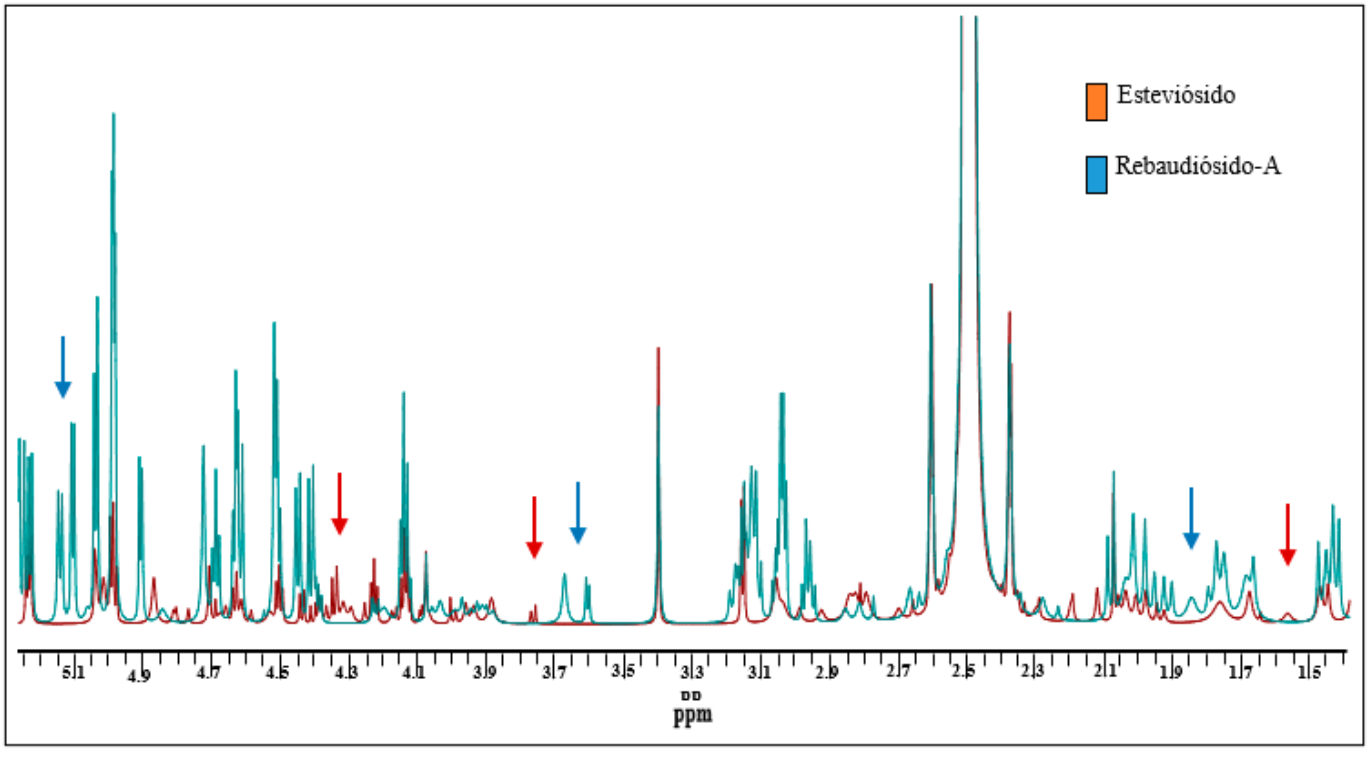


Figura soporte 1. Espectros de los estándares superpuestos, correspondientes al esteviósido (rojo) y rebaudiósido-A (azul), las flechas indican los grupos distintos de señales.

Supplementary figure 1. Spectra of the superimposed standards, corresponding to stevioside (red) and rebaudioside-A (blue), arrows indicate differences in signals.

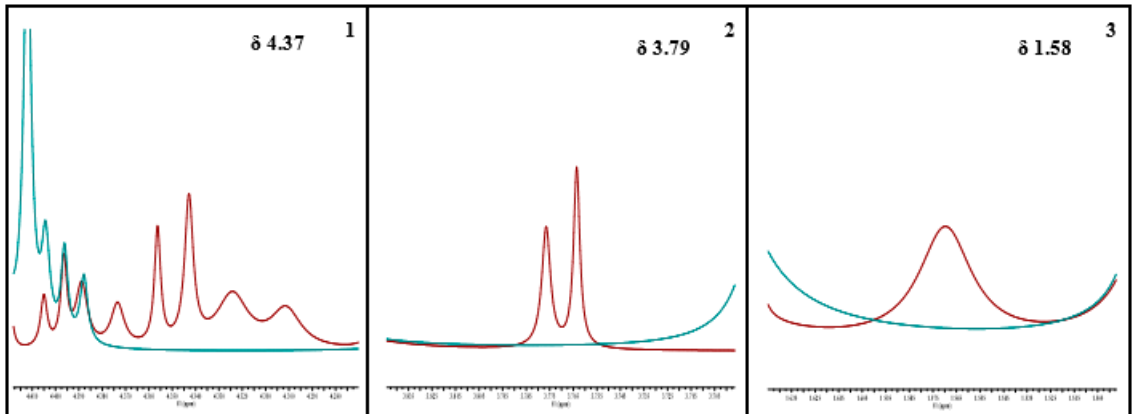


Figura soporte 2. Señales no traslapadas del esteviósido con desplazamiento químico; 1) δ 4.37, 2) δ 3.79, 3) δ 1.58.
Supplementary figure 2. Non-overlapping signals from stevioside with chemical displacement: 1) δ 4.37, 2) δ 3.79, 3) δ 1.58.

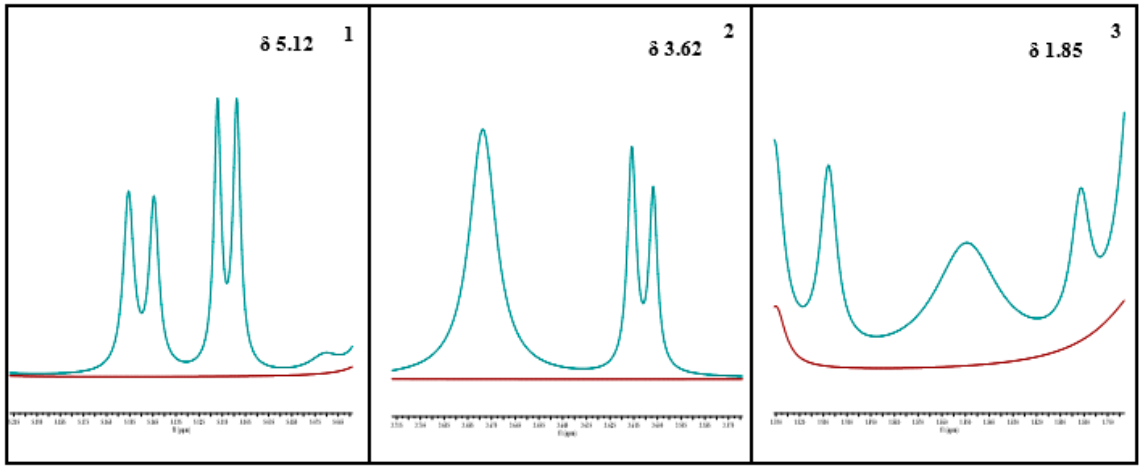


Figura soporte 3. Señales no traslapadas del rebaudiósido-A con desplazamiento químico. 1) δ 5.12, 2) δ 3.62, 3) δ 1.85.
Supplementary figure 3. Non-overlapping signals from rebaudioside-A with chemical displacement: 1) δ 5.12, 2) δ 3.62, 3) δ 1.85.

En cada espectro, se identificó las señales no traslapadas, la intensidad de la señal y la posición de los H-1 de acuerdo con su estructura química. En el espectro de Stv, las señales correspondientes a los H-1 se encontraron en las posiciones 25, 27 y 23 (Figura soporte 4). En el espectro de Reb-A, las señales correspondientes a los H-1 se encontraron en las posiciones 17, 21 y 4 de acuerdo con su estructura química (Figura soporte 5).

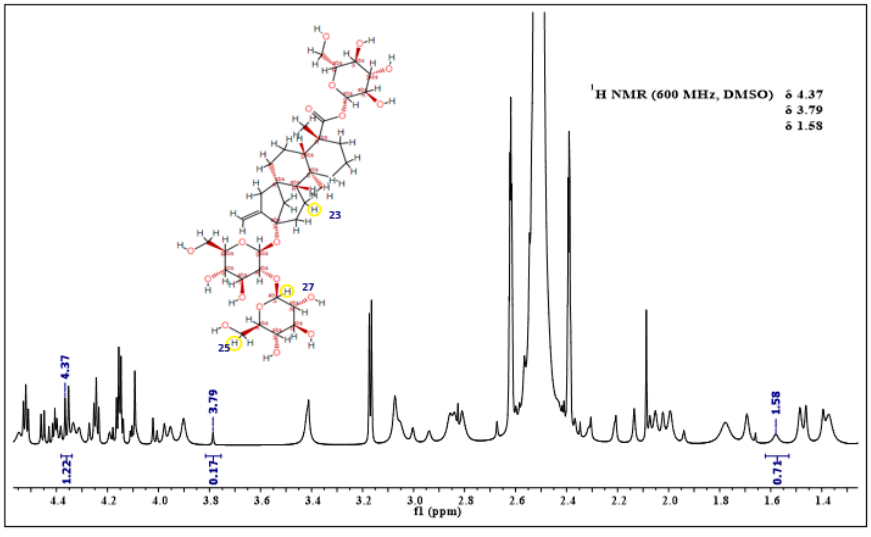


Figura soporte 4. Espectro ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) de esteviósido.
Supplementary figure 4. ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) spectra of stevioside.

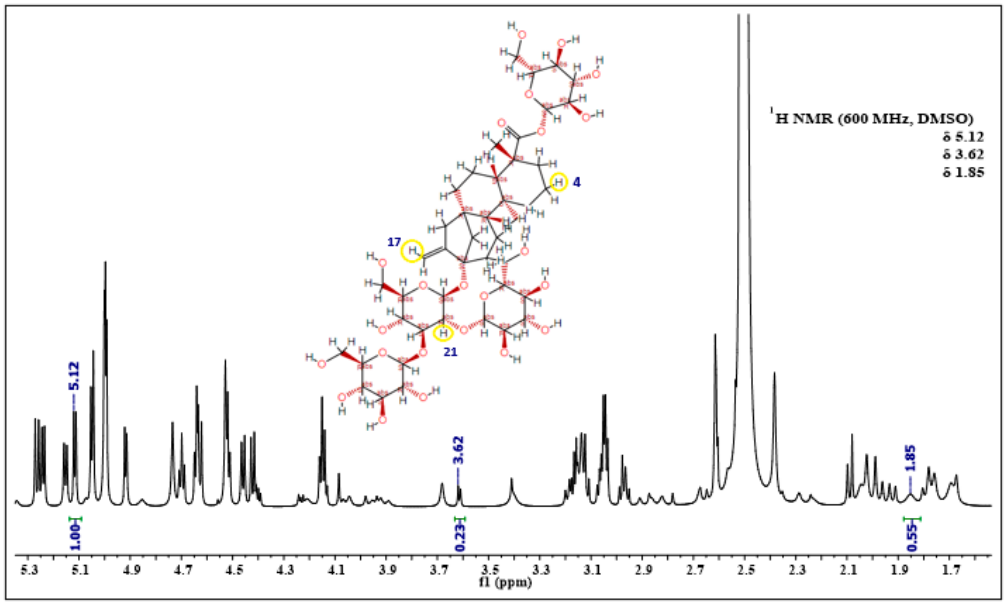


Figura soporte 5. Espectro ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) de rebaudiósido-A.
Supplementary figure 5. ^{1}H-RMN (DMSO-d_6, 600 MHz) spectra of rebaudioside-A.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Antibacterial activity of organic extracts from *Solidago graminifolia* leaves

Actividad antibacteriana de extractos orgánicos de hojas de *Solidago graminifolia*

Guadalupe Tobías[1], José Ramírez De León[2], Juan Francisco Castañón Rodríguez[2], Francisco A. Paredes-Sanchez[1], Alma D. Paz-González[3], Gildardo Rivera[3] and Verónica Herrera-Mayorga[1]*

[1] Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, 89840, El Mante, Tamaulipas, México.
[2] Unidad Académica de Trabajo Social y Ciencias para el Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario, 87120, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.
[3] Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, 88710, Reynosa, Tamaulipas, México.

ABSTRACT

Solidago graminifolia (syn. *Euthamia graminifolia* (L.) Nutt) is a native species plant from North America, with abundant flavonoids, diterpenes, and polyacetylenes metabolites, that have shown cholinesterase enzyme inhibitory activity and antimicrobial activity. The aim of this study was to determine the antibacterial activity of *Solidago graminifolia* leaf extracts obtained with ethanol, dichloromethane, and hexane solvents. The *S. graminifolia* extracts were tested against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. The chemical composition of each extract was analyzed by UPLC-MS/MS. The extracs yields in ethanolic, dichloromethane and hexanoic solvents were 20.39 %, 18.34 %, and 5.3 %, respectively. The secondary metabolites identified were flavonoids, hyperoxide, quercetin, kaempferol, and some phenolic acids, such as chlorogenic acid and solidagoic acid derivatives. The ethanolic extract inhibited the five strains in all concentrations (15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, and 2.5 mg/mL). The ethanol extract has a MIC of 2.0 mg/mL against *S. aureus* and 1.5 mg/mL for the Gram-negative bacteria *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*; the dichloromethane extract has MIC values of 2.5 mg/mL for Gram-negative strains and 2.0 mg/mL for *S. aureus*. This study showed that the ethanolic extract had the best antibacterial activity, and its biological activity can be attributed to its richness in polyphenolic compounds.

Keywords: plant, secondary metabolites, gram-negative.

RESUMEN

Solidago graminifolia (sin. *Euthamia graminifolia* (L.) Nutt) es una especie nativa de Norteamérica; es una especie abundante en flavonoides, diterpenos y policacetilenos, con actividad antimicrobiana e inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa. El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de tres extractos (etanol, diclorometano, hexano) de la planta *S. graminifolia* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. La composición química de cada extracto fue analizada mediante UPLC-MS/MS. El rendimiento en los extractos de etanol, diclorometano y hexano fue 20.39 %, 18.34 % y 5.3 %, respectivamente. Los metabolitos secundarios identificados fueron flavonoides, hiperósidos, quercetina, kaempferol y ácidos fenólicos, derivados del ácido clorogénico y solidagoico. El extracto etanólico inhibió las cinco cepas en todas las concentraciones (15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL). El extracto etanólico tuvo una CMI de 2.0 mg/mL contra *S. aureus* y 1.5 mg/mL contra las bacterias Gram negativas *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; el extracto de diclorometano tuvo valores de CMI de 2.5 mg/mL para las cepas Gram negativas y 2.0 mg/mL para *S. aureus*. Este estudio mostró que el extracto etanólico tiene la mejor actividad antibacteriana y su actividad biológica puede ser atribuida a la presencia de compuestos polifenólicos.

Palabras clave: plantas, metabolitos secundarios, gran-negativa.

INTRODUCTION

Plants are an important source of secondary metabolites with a wide chemical diversity and different biological properties (Starks *et al*., 2010). However, the type and concentration of secondary metabolites vary according to the plant species, environmental conditions, stress factors, and other elements that condition their production (Isah, 2019).

In traditional medicine, the different parts of plants are used against diverse pathologies since their extracts have various biological activities, such as antiproliferative (Nkuimi *et al*., 2020), anti-inflammatory (Yoo *et al*., 2020), antiprotozoal (De Mieri *et al*., 2017), antibacterial (Wasihun *et al*., 2023), among others. Particularly, plants of the *Artemisia* genus have shown antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 3.0 mg/mL (Zhang *et al*., 2022). Aqueous extracts of *Alkanna tinctoria* leaves, and *Punica granatum* peel extracts have antibacterial activity against multidrug-resistant pathogens such as *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with a MIC values between 12.5 mg/ml and 25 mg/mL (Khan *et al*., 2017). Interestingly, *Solidago graminifolia* has an important antifungal effect against yeasts such as *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* and an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, with a MIC of 0.048–3.12 mg/mL (Toiu *et al*., 2019).

*Author for correspondence: Verónica Herrera-Mayorga
e-mail: evherrera@docentes.uat.edu.mx
Received: March 8, 2024
Accepted: September 7, 2024
Published: October 8, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2277

The genus *Solidago* (Asteraceae) includes about 130 plant species worldwide. In particular, *Solidago graminifolia* (syn. *Euthamia graminifolia* (L.) Nutt) is a native species from North America, but there are no reports from the central region of Mexico. It is a perennial herbaceous plant with yellow flowers that has been described as a species abundant in flavonoids, such as quercetin, rutin, and astragalin metabolites, and terpenes, labdanum, diterpenes, and polyacetylenes obtained from extracts of the aerial part and roots of the plant (Szymura and Szymura, 2016; Móricz *et al*., 2020). Another similar species, *Solidago virgaurea* L., also has antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antifungal, and antiparasitic potential (Fursenco *et al*., 2020). In addition, its extracts have been associated with antimicrobial activity against the strains *Bacillus subtilis* F1276, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, and *Aliivibrio fischeri*. The *Solidago graminifolia* extracts have been previously described with a promising antimicrobial effect on *Staphylocccus aureus* and *Candida albicans* species, these evaluations have been carried out in countries such as Romania and Poland (Kołodziej *et al*., 2011; Toiu *et al*., 2019). However, in our country it has not been carried out; therefore, it becomes necessary to know the biological capacity of the extracts in bacteria that impairs human health. Hence, the aim of this research was to evaluate the antibacterial activity of three organic extracts of *Solidago graminifolia* against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica*, and to determine the secondary metabolites involved.

MATERIAL AND METHODS

Plant material collection

Leaves of *Solidago graminifolia* were collected from the municipality of Villa de Cos, Zacatecas, and Santo Domingo, San Luis Potosí, with the latitude coordinates 23.2592960-102.2226380. The plant material was placed in airtight bags and transferred to the Chemistry-Biochemistry laboratory of the Mante Multidisciplinary Academic Unit of the Autonomous University of Tamaulipas. The collected specimens were sent to the Institute of Ecology A.C. for genus and species identification, consulting specialized botanical literature and specialists of the Asteraceae family. The ITS region was amplified for molecular identification using the primers ITS-20F 5′-TCGCGTTGACTACGTCCCTGCC-3′ and ITS-262R 5′ -ATTCCCAAACAACCCGACTCG-3′ with the PCR reaction and sequencing conditions described by Herrera-Mayorga *et al.* (2022).

Obtention of organic extracts

The collected leaves were placed on aluminum trays for drying in an oven at 60 ˚C for 2 days. Subsequently, the leaves were manually pulverized until a small particle size was obtained. Solvents were used in a polarity gradient (ethanol, dichloromethane, and hexane) to obtain the extracts; 100 grams of pulverized leaves were placed in a 1 L flask with 500 mL of the corresponding solvent under constant stirring for seven days protected from light. Afterward, the solvents were filtered under a vacuum to eliminate plant material remains. The crude extract was obtained by placing the sample in a rotary evaporator at a temperature no higher than 40 °C.

Ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry (UPLC-MS) analysis

One milligram of crude extract sample was weighed, dissolved in 1 mL of HPLC grade solvent, and filtered through a 0.45 µm syringe filter for analysis. The UPLC-MS/MS was carried out with an ACQUITY UPLC system coupled to a Waters QDA® mass detector (Milford, MA, USA) and an ACQUITY UPLC CORTECS® C18 1.6 µm column 3.0 x 100 mm in positive Ion mode. The column temperature was 40 °C, and the autosampler temperature was 15 °C. Elution was achieved with 0.1 % formic acid in water (Phase A), acetonitrile (Phase B), and 5 mM ammonium acetate (Phase C). The flow rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 5 µL. The composition of the solvents over time was initial A: 5 %; B: 85 %; C: 10 %, at 3.0 min increase, A: 15 %; B: 75 %; C: 10 %, changing at 10.0 min to A: 5 %; B: 85 %; C:10 %. The running time was 15.0 min.

Bacteria isolation and identification

The bacteria in this study were isolated from agricultural bean and corn fields soil samples, at the municipality of Fresnillo de González Echeverria (23°12′ N, 103° 30′W). The bacteria were identified molecularly by amplifying the 16S ribosomal gene and bidirectional sequencing (Herrera-Mayorga *et al*., 2023). Genomic DNA was extracted using the commercial Promega Wizard® Genomic kit (Promega A1120, USA) according to the protocol described by the manufacturer. The endpoint polymerase chain reaction was carried out using the primers Bac1-FW 5′-AGAGAGTTTGATCVTGGCTCAG-3′ and 16S-1400 RV 5′-GCGGGTGTGTGTACAAGGCCCG-3′ (Criollo *et al*., 2012), with a final reaction volume of 25 µL. The reaction was carried out with an amplification program that consisted of an initial denaturation cycle at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 3 min in a Labnet MULTIGENE TM MINI thermocycler. The amplicons were visualized on 1.5 % agarose gel using PROMEGA's 100 bp molecular weight marker (Madison, Wis., USA). The quality of the PCR products was analyzed with a photodocumenter using the Alphalmager HP system.

The PCR product was purified using the ExoSAP-IT® protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA). Subsequently, the bidirectional sequencing reaction was carried out using the conditions indicated in the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit of the ABI 3130 system (Applied Biosystems, Foster City). The electropherogram obtained was visualized, edited, and assembled with the Chromas Lite 2.1 program (Technelysium) and SeqMan from the commercial DNASTAR suite of Lasergene 8 (Madison, WI). Finally, the assembled nucleotide sequences were compared with the NCBI nr/nt database using the BLASTn program for identification of the

selected bacteria ClustalW (homology > 99%) (Koolivand *et al*., 2019).

Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activity of the crude extracts was determined with the agar diffusion technique at four different concentrations: 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, and 2.5 mg/mL using chloramphenicol (50 µg/mL) as a positive control (Mojica *et al*., 2015). The preparation consisted of weighing the corresponding amount of each extract in a 1.5 mL Eppendorf tube, and then dissolved in 2 % DMSO. Once dissolved, it was placed in a vortex to stir until a homogeneous mixture was obtained, which, with the help of a micropipette, was added to the center of the sterile petri dish. The liquid agar was immediately poured, and the box was covered, mixing with rotary movements. Finally, each box was allowed to solidify. Each evaluation was done in triplicate and under sterile conditions (Ramírez and Marín, 2009).

A bacterial suspension was prepared for the inoculum in 0.85 % saline solution from a 24 h culture at 35 °C in nutrient agar. The inoculum solution was adjusted to tube number 5 McFarland using a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm, obtaining a suspension at a concentration of 1 x 10^6 CFU/mL. From this suspension, 1 µL of each bacterial suspension was taken with a micropipette and sterile tips, and placed in the corresponding quadrant, trying not to pierce the agar and placing the drop as central as possible. After inoculating each box (except the negative or sterility control), it was incubated at 35 °C for 24 h. It is important to mention that each evaluation was done in triplicate and under sterile conditions. From the last two concentrations, dilutions were worked out for the measurement of MIC for each of the strains.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination

The MIC was determined only for the extracts with antibacterial activity (ethanol and dichloromethane). The evaluation was carried out with 5 concentrations (5.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, and 0.1 mg/mL) to which the inoculum was added at 1x10^6 CFU/mL. Duplicates were worked with the same concentrations but without adding the inoculum to compare the turbidity of the medium. The corresponding sample was weighed in the tube with the highest concentration and subsequently dissolved in 2 % DMSO to prepare the samples with extract. The desired concentrations were adjusted in nutritious broth once a homogeneous mixture of the extract and solvent was obtained. The MIC was defined as the lowest concentration of the extract capable of total inhibition compared to the 100 % growth control (Da Silva *et al*., 2019).

RESULTS AND DISCUSSION

Plant identification

The plant was identified as *Solidago graminifolia* (syn. *Euthamia graminifolia* (L.) Nutt) by botanical experts, and genotypically had a sequence homology of 96 % (744/779) with the *Solidago graminifolia* MT610936.1 sequence. A specimen of the plant was identified taxonomically and deposited in the herbarium of Francisco González Medrano with the code UAT-22866. This species is native from North America, however, to our knowledge, this is the first report of its presence in Mexico in the states of San Luis Potosi and Zacatecas. Currently, the identification of plants by molecular biology is an easy and unexpensive tool that could be used as complementary to the traditional identification.

Organic extracts yield

The yield of organic extracts obtained by maceration from *S. graminifolia* leaves had a value of 20.39 % with ethanol, followed by dichloromethane with 18.34 %. The hexanoic extract had the lowest yield with 5.3 %. In general, the yields obtained could be considered low because, in previous research, Toiu *et al*. (2019) mention that the extracts from the aerial part of *S. graminifolia* with polar solvents, such as methanol and ethanol, produce a higher yield with values ranging from 28.01 % and 31.17 %, respectively. Additionally, they mention that polar solvents produce a high yield of total polyphenol content (192.69 mg/g extract) and flavonoids (151.41 mg/g extract), compared to chloroform (40.5 mg/g) and petroleum ether (121.2 mg/g) as non-polar solvents. This can be attributed to factors such as the solubility in the solvents, since in our study absolute ethanol was used and the authors worked with a 70 % ethanol ratio 1:20; as a medium polarity solvent, chloroform was used instead of dichloromethane and as a non-polar solvent petroleum ether while we used hexane. Another variant was the time and temperature of extraction which was worked by the authors at 60 °C with a time of 50 min, while our conditions were stirring at room temperature for seven days.

UPLC phytochemical analysis

The UPLC analysis of the organic extracts from *S. graminifolia* leaves allowed the detection of some previously reported secondary metabolites (Table 1). The most representative metabolites were flavonoids, among which were quercetin and kaempferol. In general, flavonoids are a group of molecules with greater abundance in plants, and this group of metabolites are considered to be of low toxicity and a high pharmacological capacity (Tafroji *et al*., 2022). Both metabolites have been described for their oxidative properties and for being involved in the growth inhibition of bacteria and other microorganisms, which have made them an alternative for the development of new drugs whose mechanism of action has been described in Gram positive and negative bacteria, such as *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*, where the greatest damage has been observed in the cell membrane causing rupture, activation of apoptosis and inhibition of the synthesis of nucleic acids and proteins. It has also been reported that combined, these two metabolites enhance the antibacterial activity by participating in the interruption of fatty acid biosynthesis, and of the formation of bacterial biofilms in strains of *Mycobacterium*, *Pseudomonas*

Table 1. Secondary metabolites in organic extracts identified by molecular weight of the plant *Solidago graminifolia* by UPLC-MS.
Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados mediante sus pesos moleculares en los extractos orgánicos de la planta *Solidago graminifolia* realizado mediante UPLC-MS.

Extract	Chemical name	Chemical formula	Molecular weight	Molecular ion Detected m/z
Ethanol	Solidagoic acid G	$C_{21}H_{27}O_5$	361.20	361.13
	Quercetin 3-O-(6″-malonyl) hexoside	$C_{24}H_{22}O_{15}$	549.42	549.23
	Solidagoic acid E	$C_{20}H_{27}O_5$	347.15	347.09
	Solidagoic acid C	$C_{20}H_{26}O_4$	331.00	331.10
	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302.23	303.19
Dichlormethane	16-Acetoxy-17-hydroxy-7,13Z-labdadien-15-oic acid	$C_{22}H_{34}O_5$	378.0	377.11
	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302.23	303.28
	Murratin K	$C_{20}H_{27}O_7$	379.17	379.25
	Solidagoic acid B	$C_{25}H_{34}O_5$	414.53	415.18
	Quercetin 3-O-α-L-arabinopyranoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	434.3	437.17
	NR	---	---	102.05
Hexane	Rhein 8-b-D-Glucuronide	$C_{21}H_{16}O_{12}$	460.34	460.25
	1,7-Dihydroxyxanthone-6-O-B-D-glucopyranoside	$C_{19}H_{19}O_{10}$	407.09	407.28
	NR	---	---	389.25
	Luteolin 7-O-beta-D-Glucuronide	$C_{21}H_{17}O_{12}$	461.4	461.25
	Solidagoic acid B	$C_{25}H_{34}O_5$	414.53	415.24
	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	288.25	288.25

NR: Not reported.

aeruginosa and *Vibrio cholerae* (Nguyen and Bhattacharya, 2022; Periferakis *et al*., 2022). Other constituents detected were phenolic acids, such as chlorogenic and solidagoic acid derivatives, this group of metabolites are produced by many plants to defend themselves against bacteria. Their mechanisms involve the alteration of physiological pathways for biofilm formation, membrane destruction, and alterations of cellular transport (Chen *et al*., 2022; Bozsó *et al*., 2024).

According to their polarity, some secondary metabolites identified in the ethanolic extract were quercetin and solidagoic acid derivatives (E, G, and H). These metabolites are highly polar, which justifies their extraction and have been identified in *S. virgaurea* and *S. gigantea* extracts, the presence of these constituents has been associated with antimicrobial activity (Starks *et al*., 2010; Jaisinghani, 2017). In the hydroalcoholic or polar extractions of the roots and leaves of the genus *Solidago*, large quantities of clerodane diterpenes such as solidagoic acids have been described; however, this group of metabolites, despite being very specific to this genus, has not been described in the phytochemical profile of *Solidago graminifolia* (Toiu *et al*., 2019). This may be due to the fact that this group of constituents are produced by the plant as a defense mechanism against high temperatures, which is an environmental factor in the region where it was sampled. The most abundant secondary metabolites in the dichloromethane and hexane extracts were coumarins, labdane diterpenes, and glycosidic derivatives. As reported by Toiu *et al*. (2019), there is a large difference between the content of extracted metabolites and the order of polarity, where substances such as ethanol achieve greater efficiency and diversity of metabolites due to their diffusion capacity and solubility, about four times greater than non-polar solvents such as petroleum ether or chloroform, however, solvents such as hexane reduce the matrix between polar compounds and make the extraction of non-polar or semi-polar compounds more efficient.

Other secondary metabolites that were identified in this work have been obtained from the aerial parts and roots of plants from the genus *Solidago* by different authors, such as acetylenes (esters of feverfew and dehydromatricaria), clerodane diterpenes (kingidiol and solidagoic acid A), labdane diterpenes (solidagenone and presolidagenones), benzyl benzoate and terpene derivatives, which have shown antibacterial activity and pharmacological interest (Toiu *et al*., 2019; Baglyas *et al*., 2022; Bozsó *et al*., 2024).

Bacteria identification and Antibacterial activity

The isolates obtained from agricultural soils were enteropathogenic strains (Table 2). The organic extracts were evaluated against the strains identified at four concentrations to determine their potential antibacterial activity (Table 3). The ethanolic extract had antibacterial activity against the five strains at every evaluated concentration. A similar result was found with the dichloromethane extract, except at the concentration of 2.5 mg/mL, which allowed the growth of four bacteria. Finally, it was not possible to determine the antibacterial activity in the hexanoic extract due to poor solubility in the aqueous solution. This finding may be associated with the type of non-polar components, such as kaempferol, one of the extract's most abundant secondary metabolites. This metabolite is described as a very hydrophobic molecule, practically insoluble in water, and whose main associated biological activity is its antioxidant nature in neurological diseases such as Parkinson's, Alzheimer's, epilepsy, depressive disorder, anxiety disorder, and others (Silva *et al*., 2021).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of the extracts against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, are shown in Table 4. The ethanolic extract of *S. graminifolia* had lowest MIC value (2.0 mg/mL for *S. aureus* and 1.5 mg/mL for the Gram-negative bacteria *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*). The MIC of the dichloromethane extract was slightly higher than the ethanolic extract in the case of four bacteria (2.5 mg/mL) and had the same MIC value for *S. aureus*.

Our biological activity results are similar to those described by Toiu *et al.* (2019). They obtained MIC values between 0.048 and 3.12 mg/mL for ethanol extracts of the *S. graminifolia* plant and values of 0.096 and 3.12 mg/mL for methanol extracts, against Gram-positive and negative bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Our results and those of these authors suggest moderate activity against the bacterial strains evaluated since it is estimated that MIC levels around or less than 0.5 mg/mL suggest good antibacterial activity (Salvat *et al*., 2004).

Table 2. Bacterial strains isolated and molecularly identified.
Tabla 2. Cepas bacterianas aisladas e identificadas molecularmente.

Bacteria	Strain	Gram	Characteristic
Escherichia coli	LB226692	Negative	Enteropathogenic
Salmonella enterica	IITRCS06	Negative	Enteropathogenic
Staphylococcus aureus	NI	Positive	Enteropathogenic
Pseudomonas aeruginosa	M23	Negative	Water quality indicators
Klebsiella pneumoniae	YH43	Negative	Present in agricultural soils, fixing N_2

*NI: Not identified.

Table 3. Antibacterial activity of organic extracts of *S. graminifolia*.
Tabla 3. Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *S. graminifolia*.

Extract	[ ] (mg/mL)	Strain				
		***E. coli* LB226692**	***S. enterica* IITRCS06**	***S. aureus* NI**	***P. aureginosa* M23**	***K. pneumoniae* YH43**
EtOH	15	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-
DCM	15	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	2.5	+	+	-	+	+
Hex	15	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND	ND
	2.5	ND	ND	ND	ND	ND
Control	Positive	+	+	+	+	+
	Negative	-	-	-	-	-
	Antibiotic/ Bacteria	-	-	-	-	-
	Antibiotic/ Solvent/ Bacteria	-	-	-	-	-
	Solvent	+	+	+	+	+

ND: not determined; (-): showed null growth; (+): showed growth; EtOH: ethanol; DCM: dichloromethane; Hex: hexane; [ ]: concentration.

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (mg/mL) of the organic extracts from *S. graminifolia*.
Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL) de los extractos orgánicos de *S. graminifolia*.

Bacteria	Minimum Inhibitory Concentration [mg/mL]	
	Ethanol	Dichloromethane
Escherichia coli	1.5	2.5
Klebsiella pneumoniae	1.5	2.5
Salmonella enterica	1.5	2.5
Staphylococcus aureus	2.0	2.0
Pseudomonas aeruginosa	1.5	2.5

The extract with the best antibacterial activity was the ethanolic extract of *S. graminifolia* possibly due to its richness in polyphenolic compounds (Alves *et al*., 2013), where metabolites such as quercetin may exert a possible antibacterial activity with an ability to eliminate biofilm formation in *Bacillus subtilis* FB17, and *Enterococcus faecalis* MTCC2729 strains. In addition, the quercetin molecule causes suppressing adhesion expression in the strains *S. aureus* ATCC 6538 and ATCC 25923 (Yang *et al*., 2020).

Other representative secondary metabolites (ethanol and dichloromethane) in the extracts were phenolic acids such as solidagoic acid derivatives. Clerodane diterpenes identified by UPLC-MS as solidagoic acid have sparked interest in recent years due to their notable antibacterial, antifungal, antitumor, antifeedant for insects, and other biological activities (Li *et al*., 2016). Four bioactive diterpenes have been described in *S. gigantea* plant extracts: solidagoic acid E, solidagoic acid F, solidagoic acid H, and solidagoic acid I; the latter two have acted with moderate antibacterial activity against Gram-positive *Bacillus subtilis* subsp strains *spizizenii* and *Rhodococcus fascians* with IC_{50} values of 32.3-64.4 µg/mL (Baglyas *et al*., 2022).

CONCLUSIONS

This study determined that the ethanolic extract of *Solidago graminifolia* leaves presents antibacterial activity against *E. coli* LB226692, *S. enterica* IITRCS06, *S. aureus* NI, *P. aeruginosa* M23 and *K. pneumoniae* YH43 strains, with MIC values of 1.5 to 2.0. mg/mL. This biological activity can be attributed to secondary metabolites such as quercetin and clerodane diterpenes such as solidagoic acid E, G, and H, suggesting that these active metabolites may provide a starting point for developing or identifying more active compounds. Additionally, this research confirms the potential of this plant, which has been little studied in Mexico, and its high flavonoids and phenolic contents in ethanolic extracts. It also highlights the need for studies to improve extraction techniques and elucidate the mechanisms of action involved in the antibacterial activity for the creation of new pharmaceutical products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank the support of the "Unidad Académica Multidisciplinaria Mante-Universidad Autónoma de Tamaulipas" and M.C. Óscar Hinojosa Espinosa, Dr. Arturo Mora Olivo for the taxonomic identification of *S. graminifolia*.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., and Pintado, M. 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. Journal of Applied Microbiology. 115:346-357.

Baglyas, M., Ott P.G., Garádi, Z., Glavnik, V., Béni, S., Vovk, I., and Móricz, Á.M. 2022. High-performance thin-layer chromatography - antibacterial assay first reveals bioactive clerodane diterpenes in giant goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.). Journal of Chromatography A. 1677:463308.

Bozsó, Z., Lapat, V., Ott, P.G., and Móricz, Á.M. 2024. Disparate effects of two clerodane diterpenes of giant goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.) on *Bacillus spizizenii*. International Journal of Molecular Sciences. 25:1-22.

Chen, K., Peng, C., Chi, F., Yu, C., Yang, Q., and Li, Z. 2022. Antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against *Yersinia enterocolitica*. Frontiers in Microbiology. 4:1-14.

Criollo, P.J., Obando, M., Sánchez, L. and Bonilla, R. 2013. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 13: 189-195.

Da Silva, P.M., Rodríguez, Da, S.B., de Oliveira, S.J.N., de Moura, M.C., Soares, T., Feitosa A.P.S. and Napoleão T.H. 2019. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β-lactamase-producing *Escherichia coli*. International Journal of Biological Macromolecules. 15:931-939.

De Mieri, M., Monteleone, G., Ismajili, I., Kaiser, M. and Hamburger, M. 2017. Antiprotozoal activity-based profiling of a dichloromethane extract from *Anthemis nobilis* flowers. Journal of Natural Products. 80:459-470.

Fursenco, C., Calalb, T., Uncu, L., Dinu, M., and Ancuceanu, R. 2020. *Solidago virgaurea* L.: a review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities. Biomolecules. 10:1619.

Herrera-Mayorga, V., Guerrero-Sánchez, J.A, Méndez-Álvarez, D., Paredes-Sánchez, F.A., Rodríguez-Duran, L.V., Niño-García, N., Paz-González, A.D and Rivera, G. 2022. Insecticidal activity of organic extracts of *Solidago graminifolia* and its main metabolites (quercetin and chlorogenic acid) against *Spodoptera frugiperda*: an in vitro and in silico approach. Molecules. 27:1-11.

Herrera-Mayorga, V., Ochoa-Esparza, D.L., Delgado-Maldonado, T., Paz-González, A.D., Paredes-Sánchez, F. and Rivera, G. 2023. Analysis of the α-cypermethrin biodegradation by *Klebsiella pneumoniae* YH43. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. *39*: 417-427.

Isah, T. 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological Research. 52:1-25.

Jaisinghani, R.N. 2017. Antibacterial properties of quercetin. Microbiology Research. 8:13-14.

Khan, I., Rahman, H., Abd El-Salam, N.M., Tawab, A., Hussain, A., Khan, T.A., Khan, U.A., Qasim, M., Adnan, M., Azizullah, A., Murad, W., Jalal, A., Muhammad, N. and Ullah, R. 2017. *Punica granatum* peel extracts: HPLC fractionation and LC MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. BMC complementary and alternative medicine. 17:1-6.

Kołodziej, B., Kowalski, R. and Kędzia, B. 2011. Antibacterial and antimutagenic activity of extracts aboveground parts of three *Solidago* species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago canadensis* L. and *Solidago gigantea* Ait. Journal of Medicinal Plants Research. 5: 6770-6779.

Koolivand, A., Abtahi, H., Godini, K., Saeedi, R., Rajaei, M.S., Parhamfar, M. and Seifi H. 2019. Biodegradation of oil tank bottom sludge using a new two-phase composting process: kinetics and effect of different bulking agents. Journal of Material Cycles and Waste Management. 21:1280-1290.

Li, R., Morris-Natschke, S.L., and Lee, K.H. 2016. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. Natural Product Reports. 33:1166-1226.

Mojica, Á.D.N., Ramírez-Rueda, R.Y. and Espitia, M.M.I. 2015. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. Salud y Sociedad Uptc. 2:27-32.

Móricz, Á.M., Jamshidi-Aidji, M., Krüzselyi, D., Darcsi, A., Böszörményi, A., Csontos, P., Béni, S., Ott, P.G. and Morlock, G.E. 2020. Distinction and valorization of 30 root extracts of five goldenrod (*Solidago*) species. Journal of chromatography A. 1611:1-9.

Nguyen, T.L.A. and Bhattacharya, D. 2022. Antimicrobial activity of quercetin: An approach to its mechanistic principle. Molecules. 27:1-13.

Nkuimi, W.J.G., Quassinti, L., Gudžinskas, Z., Nagy, D.U., Cianfaglione, K., Bramucci, M. and Maggi, F. 2020. Chemical composition and antiproliferative effect of essential oils of four *Solidago* species (*S. canadensis, S. gigantea, S. virgaurea* and *S.*×*niederederi*). Chemistry & Biodiversity. 17: 1-14.

Periferakis, A., Periferakis, K., Badarau, I.A., Petran, E.M., Popa, D.C., Caruntu, A., Costache, R.S., Scheau, C., Caruntu, C. and Costache, D.O. 2022. Kaempferol: Antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications. International journal of molecular sciences. 23: 1-39.

Ramírez, L.S. and Marín, C.D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. 15: 263-268.

Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y. and Godoy H.M. 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. Phytomedicine: international Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology. 11: 230-234.

Silva, D.S.J., Gonçalves, C.J.P., de Oliveira, C.P. and Ortega M.M. 2021. The pharmacological action of kaempferol in central nervous system diseases: a review. Frontiers in Pharmacology. 11(1): 1-15.

Starks, C.M., Williams, R.B., Goering, M.G., O'Neil-Johnson, M., Norman, V.L., Hu, J. F., Garo, E., Hough, G.W., Rice, S.M. and Eldridge, G.R. 2010. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). Phytochemistry. 71: 104-109.

Szymura, M. and Szymura, T.H. 2016. Interactions between alien goldenrods (*Solidago* and *Euthamia* species) and comparison with native species in Central Europe, Flora-Morphology. Distribution, Functional Ecology of Plants. 218:51-61.

Tafroji, W., Margyaningsih, N.I., Khoeri, M.M., Paramaiswari, W.T., Winarti, Y., Salsabila, K., Putri, H. F.M., Siregar, N.C., Soebandrio, A. and Safari D. 2022. Antibacterial activity of medicinal plants in Indonesia on *Streptococcus pneumoniae*. PloS one. 17:1-23.

Toiu, A., Vlase, L., Vodnar, D.C., Gheldiu, A.M. and Oniga, I. 2019. *Solidago graminifolia* L. Salisb. (*Asteraceae*) as a valuable source of bioactive polyphenols: HPLC profile, *in vitro* antioxidant, and antimicrobial potential. Molecules. 24:1-15.

Wasihun, Y., Alekaw, H.H. and Dires, A.K. 2023. Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extract of *Calpurnia aurea*. Scientific Reports. 13:1-7.

Yang, D., Wang, T., Long, M. and Li, P. 2020. Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020:1-13.

Yoo, S-R., Ha, H., Shin, H-K. and Seo, C.-S. 2020. Anti-inflamatory activity of neolignan compound isolated from the roots of *Saururus chinensis*. Plants. 9:1-5.

Zhang, J.J., Qu, L.B., Bi, Y.F., Pan, C.X., Yang, R. and Zeng, H.J. 2022. Antibacterial activity and mechanism of chloroform fraction from aqueous extract of mugwort leaves (*Artemisia argyi* L.) against *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. 74: 893-900.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Microencapsulation of pitaya juice (*Stenocereus stellatus*) by spray drying using mixtures of fructans, whey protein, and modified starch as carrier agents

Microencapsulación de jugo de pitaya (*Stenocereus stellatus*) por secado por aspersión usando mezclas de fructanos, proteína de suero y almidón modificado como agentes acarreadores

María Aurora Soto-Dagnino[1], Miguel Ángel Sánchez-Madrigal[1], Erick Heredia-Olea[2], Carmen Oralia Meléndez-Pizarro[1], Rosa Isela Ortiz-Basurto[3], Daniel Lardizábal-Gutiérrez[4], Francisco Paraguay-Delgado[4], David Neder-Suárez[1] and Armando Quintero-Ramos[1]*

[1] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario s/n, Campus UACH II, C. P. 31125, Chihuahua, Chih., México.
[2] Centro de biotecnología FEMSA, Tecnológico de Monterrey, Tecnológico, C. P. 64849, Monterrey, N.L., México.
[3] Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico #2595. Col. Lagos del Country, C. P. 63175, Tepic, Nayarit, México.
[4] Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. Avenida Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua, C. P. 31109, Chihuahua, Chih., México.

ABSTRACT

The proportions of agave fructans (FRU), octenyl succinate starch (OSA starch), and whey protein concentrate (WPC) as carrier agents for the encapsulation of pitaya juice composed of a mixture of red and orange pitayas were evaluated using a D-optimal mixture design. The carrier agents had a significant effect on betalains and polyphenol contents, antioxidant activity, and yield of encapsulation, as well as on luminosity, and *b** parameter of resuspended encapsulates which resulted with the highest values at high proportions of WPC. Also, WPC decreased the hygroscopicity and increased the glass transition temperature**;** however, it led to a structure characterized by fissures and porous surfaces in the encapsulates. Optimum encapsulated corresponded to a mixture of 7.1 % FRU, 82.9 % WPC, and 10 % OSA starch based on reaching the maximum of betalains, polyphenols, antioxidant activity, yield of encapsulation, and *b** parameter of color. These results suggest that a mixture of FRU and OSA starch with a high proportion of WPC is a good alternative to improve pigment preservation of pitaya juice.

Keywords: *Microencapsulation, pitaya juice, betalains, spray-drying, optimization*.

RESUMEN

Proporciones de fructanos de agave (FRU), almidón succinato de octenilo (almidón OSA) y concentrado de proteína de suero (WPC) fueron evaluados como agentes acarreadores en la encapsulación del jugo de pitaya compuesto por una mezcla de pitayas rojas y naranjas bajo un diseño de mezclas D-óptimo. Los agentes acarreadores tuvieron un efecto significativo sobre los contenidos de betalaínas y polifenoles y la actividad antioxidante, rendimiento de encapsulación, así como sobre la luminosidad y el parámetro *b** de los encapsulados resuspendidos, lo que resultó con los valores más altos a proporciones altas de WPC. Además, el WPC disminuyó la higroscopicidad y aumentó la temperatura de transición vítrea, sin embargo, produjo una estructura caracterizada por fisuras y superficies porosas en los encapsulados. La mezcla óptima de los encapsulados resultó en 7.1 % FRU, 82.9 % WPC y 10 % almidón OSA, basado en alcanzar el máximo contenido de betalaínas, polifenoles, actividad antioxidante, rendimiento de encapsulación y parámetro de color *b**. Estos resultados sugieren que una mezcla de FRU y almidón OSA con alta proporción de WPC es una buena alternativa para mejorar la conservación de los pigmentos del jugo de pitaya.

Palabras clave: *Microencapsulación, jugo de pitaya, betalaínas, secado por aspersión, optimización.*

INTRODUCTION

Color is considered one of the main attributes of food appearance since it is often related to product quality and acceptability (Sharma *et al*., 2011). Usually, artificial colors are used in the food industry; however, they have been related to potential adverse effects on human health (Amchova *et al*., 2015). Therefore, natural pigments are a good option. Betalains are nitrogenous, water-soluble pigments classified into two groups: betacyanins (red-violet color) and betaxanthins (yellow-orange color). They can be found in several plant tissues, roots, and fruits. Pitaya (*Stenocereus stellatus*) is found naturally in a variety of colors, being red and orange a promising source of betalains and its juice can be used as a food additive without imparting flavor and simultaneously covering an extensive color spectrum (Hussain *et al*., 2018). Moreover, betalains have been reported to have therapeutic applications such as antimicrobial, antimalarial, anti-lipidemic and as anti-cancer (Gengatharan *et al*., 2015).

Despite their benefits, the stability of betalains is affected by environmental factors such as heat, pH (> 6), and light exposure. Thus, establishing novel preservation methods to achieve stability could offer some advantages. To achieve

*Author for correspondence: Armando Quintero-Ramos
e-mail: aquinter@uach.mx; aqura60@gmail.com
Received: February 24, 2024
Accepted: August 8, 2024
Published: September 4, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2268

this, encapsulation techniques have been applied owing to their low cost, simplicity, and efficient preservation of bioactive compounds (Fang and Bhandari, 2010; Krishnaiah *et al*., 2014). Spray drying is a widely employed technique for encapsulation due to its ease to process a variety of materials at a low cost (Borrmann *et al*., 2013). However, the drying temperature could lead to thermal degradation of functional compounds; hence, it is important to use carrier agents that can minimize the loss and preserve the functionality of these components.

A carrier agent is selected considering its possible interactions with the components of interest, increasing the retention of functional compounds, and physical properties of the encapsulates (e.g., smooth and non-damaged surfaces) or the ability to prevent adhesion to the chamber walls (Shishir and Chen, 2017). Several studies report the use of new polymers and their combinations with wall materials to increase compound retention (de Barros Fernandes *et al*., 2014; Premi and Sharma, 2017; Mahdi *et al*., 2020). For example, Lacerda *et al*. (2016) for the encapsulation of jussara (*Euterpe edulis*) pulp, used different proportions of sodium octenyl succinate starch (OSA starch), inulin, and maltodextrin. They reported that a higher proportion of OSA starch improved the anthocyanin content and antioxidant activity of the encapsulates. Furthermore, do Carmo *et al*. (2018) used maltodextrin, inulin, and whey protein isolate for beetroot extract encapsulation; a mixture of inulin and whey protein isolate resulted in improved stability of the encapsulated beetroot extract, where the presence of carrier agents modifies the balance of hydrophilic/hydrophobic sites, resulting in substantial changes in water absorption related to stability parameters.

The combination of complex carbohydrates (such as inulin or modified starch) with protein, may favor compound retention due to the possible chemical or physical interactions. Among these interactions are electrostatic or hydrogen bonding, which may occur between betalains and polymers; it is promoted by the cationic nature of the betalains (Cai and Corke, 2000). Moreover, several studies reported proteins as a good choice of wall material, especially for microencapsulation by spray-drying, because they can form thermally stable gels above 70 °C and thus minimize the degradation of bioactive compounds (Bartkowiak *et al*., 2017). Despite this advantage, carrier agent proportion in the mixture may affect properties such as color, hygroscopicity, and solubility, which are important to product stability. Optimizing the proportions of carrier agents in the mixture could minimize the pigments and other functional bio-compounds degradation, simultaneously rendering beneficial physical properties, and obtaining high-quality encapsulates. Accordingly, this study aimed to optimize a mixture with different proportions of agave fructans (FRU), octenyl succinate starch (OSA starch), and whey protein concentrate (WPC), as carrier agents on the physicochemical properties of the pitaya fruit juice encapsulated by spray drying.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Folin-Ciocalteu phenol reagent, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\cdot}$), 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), sodium carbonate, gallic acid, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol, methanol and hydrochloric acid (analytical grade) were obtained from J. T. Baker (Mexico City, Mexico). Deionized water from a Barnstead deionizer (Thermo Scientific, Dubuque, IA, USA) was obtained. FRU (Agaven®, Guadalajara, Mexico), OSA starch (Ingredion®, Queretaro, Mexico), and WPC (WPC 80 INST, America Alimentos, Guadalajara, Mexico) were used as carrier agents.

Pitaya juice obtaining

Red and orange pitaya (*S. stellatus*) fruits were collected from Sinaloa state, Mexico. Pitaya fruits were washed and processed using an industrial juice extractor. Seeds and mucilage were removed by centrifugation for 10 min at 3600 × g (Centra CL3R IEC; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). The resulting juice was a mixture of red (54%) and orange (46 %) pitayas. Then, the juice was stored at - 20 °C until further analysis. The total soluble solids (ºBrix) were measured with a refractometer (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), pH using a pH meter (Hanna Instruments, model EDGE HI2020, Woonsocket, RI, USA), color parameters, antioxidant activity, total polyphenols, quercetin, kaempferol, isorhamnetin, betacyanins, and total betalain were analyzed as describes below.

Preparation and encapsulation of pitaya juice by spray drying

Pitaya juice was mixed with different proportions of carrier agents, according to the mixture design (Table 1), each mixture was adjusted to 22.5 % of total solids (w/v). Carrier agents were added individually following the same order in each treatment, then stirred by magnetic agitation for 10 min and homogenized (Ultra-Turrax IKA T18 basic with a dispersing tool S18N-19G; IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA) for 15 min. Spray drying was performed using a pilot plant spray dryer (Niro Mobile Minor DK-2860; GEA Company, Kirchberg, Switzerland) with a rotary atomizer at an air pressure of 0.7 bar. Mixtures of 600 mL were fed using a peristaltic pump (Watson Marlow 504-U; Falmouth, Cornwall, UK) and dried at inlet and outlet temperatures of 160 and 85 °C, respectively. The encapsulates from the outlet were stored in hermetically closed glass jars for the subsequent analysis of physical and chemical properties.

Characterization of pitaya encapsulates

Physical properties

Moisture content

The moisture content of the encapsulates was determined by the gravimetric 950.02 method (AOAC, 1998). Known

Table 1. Carrier agents proportions in the mixtures* according to the D-optimal mixture design.
Tabla 1. Proporciones de los agentes acarreadores en las mezclas * de acuerdo al diseño de mezclas D-óptimo.

Mixture	Coded values			Uncoded values (carrier agent proportions)		
	X_1	X_2	X_3	Fructans (%)	Whey protein (%)	OSA starch (%)
1	0.500	0.397	0.103	50.0	39.7	10.3
2	0.000	0.100	0.900	0.0	10.0	90.0
3	0.000	0.500	0.500	0.0	50.0	50.0
4	0.436	0.100	0.464	43.6	10.0	46.4
5	0.000	0.900	0.100	0.0	90.0	10.0
6	0.247	0.653	0.100	24.7	65.3	10.0
7	0.157	0.224	0.619	15.7	22.4	61.9
8	0.330	0.684	0.283	3.3	68.4	28.3
9	0.275	0.378	0.347	27.5	37.8	34.7
10	0.493	0.232	0.275	49.3	23.2	27.5
11	0.000	0.249	0.751	0.0	24.9	75.1
12	0.247	0.653	0.100	24.7	65.3	10.0
13	0.000	0.900	0.100	0.0	90.0	10.0
14	0.000	0.100	0.900	0.0	10.0	90.0
15	0.500	0.397	0.103	50.0	39.7	10.3
16	0.436	0.100	0.464	43.6	10.0	46.4

* Each mixture was prepared based on 22.5% (w/v) solids content.

amounts of samples were dried using a vacuum dryer (Precision Vacuum Oven; Precision Scientific, Inc., IL, USA) at 70 °C for 24 h, followed by cooling at 25 ºC in desiccators. After that, samples were weighted. Analysis was carried out in triplicates and the means were reported as g of water/100 g of samples.

Water activity (a_w)
The a_w was determined using a Novasina Labmaster-aw (Axair AG, Pfäffikon SZ, Switzerland). Salt solutions at 25 °C were used to calibrate the equipment. Measurements were carried out in triplicates.

Bulk density (BD)
BD was determined for the encapsulates and carrier agents as described by Mahdi *et al*. (2020). A 2 g sample was deposited in a 10 mL empty graduated cylinder that was slightly tapped. BD was calculated as the mass ratio into the cylinder to the volume occupied. Measurements were performed in triplicates and the results are expressed as g/mL.

Water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI)
WAI and WSI were determined following the method described by Anderson *et al.* (1970) with some modifications. A sample of encapsulates (1.25 g) was added to 15 mL of deionized water and vortexed (Vortex-1; Scientific Industries Inc. Bohemia, New York, USA) and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min in a water bath. Then, the mixture was centrifuged for 10 min at 3600 × g in a Centra CL3R centrifuge. The supernatant was carefully collected into pre-weighed porcelain capsules and dried in an oven at 70 °C for 36 h. WAI was calculated by subtracting the weight of the sediment (determined after the removal of the supernatant) from the weight of the sample. WSI was calculated by dividing the weight of the dried supernatant by the weight of the sample. These analyses were carried out in triplicate.

Hygroscopicity (HYG)
Hygroscopicity was determined according to Lacerda *et al*. (2016). The encapsulates (500 mg) were stored in a desiccator containing a saturated NaCl solution (75.0 % relative humidity) at room temperature for seven days. After that, they were weighed and the hygroscopicity was expressed as a weight percent. Measurements were carried out in triplicates.

Glass transition temperature (Tg)
A differential scanning calorimeter (TA Q-200; TA Instruments, Crawley, UK) was used to determine the Tg of the encapsulates following the method of Puerta-Gomez and Castell-Perez (2015) with some modifications. The sample was placed in a closed aluminum pan and an empty pan was used as a reference. The scans were conducted under an argon atmosphere from 0 °C to 120 °C with a temperature gradient of 10 °C/min, followed by cooling to -30 °C. Measurements were carried out in duplicates and the thermograms were analyzed using the Universal Analysis Software (TA Instruments). Tg is interpreted as the midpoint of the obtained curves.

Color parameters
The color parameters were obtained for the pitaya juice and the different mixtures of juice with carrier agents before spray drying, and the resuspended encapsulates in water; adjusted at 22.5 % of total solids (w/v), to have the same solid content before spray-drying process. These were measured following the method of Lacerda *et al.* (2016) with some modifications using a Konica Minolta CR-400/410 colorimeter (Minolta Co., Osaka, Japan), previously calibrated with a tile standard. The *L** (luminosity), *a** (greenness-redness), and *b** (blueness-yellowness) values were registered. Measurements were carried out in triplicates and these values were further used to calculate the total color difference (ΔE) using the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L_1^*)^2 + (a_0^* - a_1^*)^2 + (b_0^* - b_1^*)^2} \quad (1)$$

where L_0^*, a_0^*, and b_0^* are the color coordinates of the juice and carrier agent mixture before spray drying, and L_1^*, a_1^*, and b_1^* are the color of the resuspended encapsulates.

Powder morphology
The morphological properties of the powder were investigated by scanning electron microscopy (SEM) at 1000 × (JSM-5800 LV; JEOL, Tokyo, Japan). The encapsulates of each mixture were placed on SEM stubs using two-sided adhesive tape and the samples were observed under low vacuum at 10 kV.

Yield of encapsulation (YE)

The YE for the spray drying was obtained according to Madhi *et al*. (2020), by the ratio between the total mass of the recovered encapsulates, and the mixture initially fed into the system. It was expressed as a percentage and was obtained using equation 2.

$$YE(\%) = \left(\frac{Weight\ (g)\ of\ the\ collected\ encapsulates}{Weight\ (g)\ of\ feed\ solids\ into\ the\ spray\ dryer}\right) \times 100 \quad (2)$$

Chemical properties

Extract preparation

Extracts for total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA) quantification, were prepared according to Vergara *et al*. (2014) with some modifications. Pitaya encapsulates (500 mg) were dispersed in 10 mL of methanol: acetic acid: water (50:8:42 v/v/v) and then stirred by vortexing for 1 min, sonicated (Branson 1800, 40 KHz; Danbury, CT, USA) twice for 20 min, and centrifuged at 3000 × g for 5 min in a Centra CL3R centrifuge. Supernatants were filtered through a syringe filter with a 0.45 µm nylon membrane and stored at -20 ºC for further analysis.

Total polyphenol content (TPC)

TPC was determined for both pitaya juice and encapsulated extracts following the Folin-Ciocalteu method described by Tabio-García *et al*. (2021). Measurements were carried out in triplicate and the absorbance was determined at 765 nm. A standard calibration curve was prepared using gallic acid (400 – 1400 mg of gallic acid equivalent (GAE/L). The results are expressed as mg GAE/100 g of sample.

Antioxidant activity (AA)

AA was determined for both pitaya juice and encapsulated extracts following the free radical method described by Brand-Williams *et al*. (1995), with some modifications. The reaction of 0.1 mL of each extract and 3.9 mL of DPPH· (100 µM) was carried out and after 3 h in darkness; the absorbance was measured at 517 nm. Measurements were carried out in triplicates. A Trolox calibration curve (0.1–1.2 mM of Trolox equivalent (TE) was prepared and the results are expressed as µmol TE/g of sample.

Flavonoid quantification

Flavonoid quantification was performed following the method described by Kuti (2004), for both pitaya juice and encapsulated extracts, with some modifications. Juice and extracts from the encapsulates were subjected to hydrolysis using 1 N hydrochloric acid solution in 50 % methanol to obtain flavonoid aglycones, which were quantified at 370 nm using a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC equipped with a diode array and UV-visible detector (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The separation was performed using a reverse-phase nucleosil column (Thermo Scientific Dionex C18, 5 µm, 150 × 4.6 mm). For the separation an isocratic gradient was used; the mobile phases were water acidified with phosphoric acid at pH 2.4 (A) and 100 % methanol (B) with a proportion of 65:35 (A:B), at a flow rate of 1 mL/min, and an injection volume of 20 µL. The flavonoids were identified according to their retention times. For quantification, standards HPLC grade of quercetin, kaempferol and isorhamnetin were used to perform calibration curves. The results of quercetin, kaempferol, or isorhamnetin are reported as mg/100 g of sample.

Betalains extraction

For the extraction of betalains, the method proposed by Castellano-Santiago and Yahia (2008) was followed. Briefly, 500 mg of encapsulates were dispersed in 10 mL of deionized water by vortexing for 1 min. Then, the sample was sonicated for 20 min and centrifuged at 3000 × g for 5 min in a Centra centrifuge (CL3R IEC; Thermo Electron Corporation). The supernatant was filtered through a 0.45 µm nylon filter (Millipore Corp. Burlington, Massachusetts, USA) and stored at -20 °C for subsequent analysis.

Betalain quantification

Photometric quantification of total betalains for both pitaya and encapsulated juice extracts was performed according to the method described by Cai *et al*. (1998). Betacyanin content (BC) and betaxanthin content (BX) were calculated using the following equation:

$$B(\frac{mg}{g}) = \left(A \times DF \times Mw \times \frac{Vd}{\varepsilon LWd}\right) \quad (3)$$

where A is the absorbace for betacyanins and betaxanthins of pitaya juice or encapsulated extract at 535 and 483 nm, which are their maximum wavelengths, respectively. DF is the dilution factor, Vd is the extract volume (mL), Wd is the encapsulates weight (g), and L is the cell path length (1 cm). Betanin (Mw = 550 g/mol; ε = 60000 L/[mol·cm] and indicaxanthin I (Mw = 308 g/mol; ε = 48000 L/[mol·cm] were used for betacyanins and betaxanthins quantification, respectively. Measurements were obtained in a Lambda 25 UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA. USA) in triplicate, and the results were expressed as total betalain content (TBC) in mg/g of sample, which represents the sum of BC and BX content.

Experimental design

This study was carried out under a D-optimal mixture design with the following factors: FRU (X_1), WPC (X_2), and OSA starch (X_3). Component proportions were expressed as fractions of the mixture with a sum (X_1+X_2+X_3) of 100. Preliminary tests were conducted to establish the proportions for each component resulting in the following restrictions: $0 \geq X_1 \leq 50$, $10 \geq X_2 \leq 90$, and $10 \geq X_3 \leq 90$. Table 1 shows the factors and proportions of the encapsulating agents. The resulting design had 16 runs (six model points, five points for the lack of fit, and five randomly selected replicates). Moreover, three additional treatments with each carrier agent were used as

controls. The responses were analyzed using a polynomial Scheffé model. The fitted equation is as follows:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon \quad (4)$$

where Y is the estimated response; X_1, X_2, and X_3 correspond to the linear mixture components, while X_1X_2, X_1X_3, and $X_1X_2X_3$ correspond to the binary and ternary mixture components, respectively; β_1, β_2, β_3, β_{12}, β_{13}, β_{23}, and β_{123} are the estimated coefficients.

Statistical analysis

The Design-Expert 12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) software was used to fit the model to the experimental data and create contour plots. The data was analyzed by analysis of variance and non-linear regression. Additionally, a Pearson correlation analysis was applied to evaluate the response correlation. Also, a posthoc group analysis was performed to evaluate the sensitivity of the proportions of the carrier agents in the mixtures (FRU, WPC and OSA starch), through a mean analysis among groups (mixtures with duplicates of the experimental design) by Tukey test. The significance of differences was specified at $p \leq 0.05$ using the statistical software Minitab version 16 (Minitab, 2010, State Collage, PA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of pitaya juice

The physicochemical properties of pitaya juice showed 54 % red and 46 % orange (Table 2). A high polyphenol content (679.25 mg of GAE/100 g dry basis (d.b.)) was compared to those obtained by Kim *et al*. (2011) (491 mg GAE/ 100 g d.b.) and by Pérez-Loredo *et al*. (2016) (372 to 579 mg GAE/100 g d.b.), who evaluated pitaya of different colors. Furthermore, the antioxidant activity of pitaya juice (139.98 µmol TE/g d.b.) was higher than that reported for different pitaya fruits (Pérez-Loredo *et al*., 2016). Regarding BC, the juice had 0.35 and 1.31 mg/g d.b. of BC and BX, respectively. For the same pitaya variety, Pérez-Loredo *et al*. (2016) reported 1.46 mg BC/g d.b. and 1.51 mg BX/g d.b. This BC value was higher than ours result, because it was referred to only red pitaya. The high BX content in the juice used in our study, also is observed in the color parameter *b** obtained in the juice (Table 2), indicating a good coloration (orange-yellow) provided by a high BX content of the juice used. García-Cruz *et al*. (2013) reported high BX content (2.67 mg/g d.b.) and similar in BC 0.470 mg/g d.b. The differences between these results may be due to the fruit maturity or the extraction process, as in the aforementioned studies, the flesh and seeds were included in the extraction, while in this study only the juice was used. The reported values were similar for cactus pear (1.71 mg BC/g d.b. and 0.68 mg BX/g d.b.) (Ruiz-Gutiérrez *et al*., 2014). The flavonoids isorhamnetin, quercetin and kaempferol were identified and quantified; with 1.12 mg/100 g d.b., 1.07 mg/100 g d.b. and 2.36 mg/100 g d.b., respectively. Quercetin and kaempferol contents were higher than those reported (0.709 and 0.350 mg/100 g d.b.) by García-Cruz *et al*. (2017), while isorhamnetin was not detected.

Table 2. Physicochemical properties of pitaya (*Stenocereus stellatus)* juice.
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del jugo de pitaya (*Stenocereus stellatus)*.

Determination	Juice
Total soluble solids (°Bx)	12.2 ± 0.0001
pH	4.7 ± 0.0001
Moisture content (%)	86.76 ± 0.09
Betacyanins (mg BC/g d.b.)	0.35 ± 0.03
Betaxanthins (mg BX/g d.b.)	1.31 ± 0.06
Total polyphenols (mg GAE/100 g d.b.)	679.25 ± 13.47
Antioxidant activity (µmol TE/100 g d.b.)	139.98 ± 5.20
Isorhamnetin (mg/100 g d.b.)	1.12 ± 0.03
Quercetin (mg/100 g d.b.)	1.07 ± 0.026
Kaempferol (mg/100 g d.b.)	2.36 ± 0.025
Color parameters	
*L**	37.34 ± 0.49
*a**	42.53 ± 0.56
*b**	18.21 ± 0.52

Mean ± standard deviation. BC: betacyanins; BX: betaxanthins; GAE: gallic acid equivalent; TE: trolox equivalent; d.b.: dry basis.

Characterization of pitaya encapsulates

Moisture content

The moisture content of the pitaya encapsulates was significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents in their linear effect (Table 4). The moisture content ranged from 0.7 % to 2.8 % (Table 3), corresponding to low and high FRU proportions, showing a greater significance due to its high hygroscopicity, that led to encapsulates with high moisture content. It is attributed to the affinity of the hygroscopic groups (OH^-) of the FRU for water. Similar findings were reported by de Barros Fernandes *et al*. (2014) and Sánchez-Madrigal *et al*. (2019). In contrast, higher OSA starch proportions reduced the humidity of the encapsulates. This behavior was also reported by Mehran *et al*. (2020) and Souza *et al*. (2018), and was attributed to starch modification, which reduces the water absorption capacity and improves the product stability, making this type of material suitable for encapsulation (Puerta-Gomez and Castell-Perez, 2015).

Water activity

The water activity ranged from 0.047 to 0.094 (Table 3), and it was not significantly ($p > 0.05$) affected by the carrier agents (Table 4). In comparison with other studies, these values are lower (Vergara *et al*., 2014); however, they are within the commonly observed a_w values in industrial spray drying. This low a_w could represent better stability for betalains in the encapsulates.

Bulk density

BD values ranged from 0.501 to 0.677 g/mL (Table 3). BD was significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents. BD raised, as OSA starch proportions increased (Figure 1a), showing a significant effect (Table 4). This agrees with the BD

Table 3. Physicochemical properties of pitaya (*Stenocereus stellatus)* encapsulates with different proportions of fructans, whey protein, and OSA starch, as carrier agents.
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los encapsulados de pitaya (*Stenocereus stellatus)* con diferentes proporciones de fructanos, proteína de suero y almidón OSA como agentes acarreadores.

MIXTURE	Groups	H	a_w	BD	HYG	WSI	WAI	YE	Tg	*L**	*a**	*b**	ΔE	TBC	TPC	AA	I	Q	K
1	1	2.70^{a}	0.054^{a}	0.560^{abc}	31.64^{a}	1.445^{a}	0.265^{a}	44.44^{c}	38.53^{bc}	34.04^{bc}	29.82^{a}	15.37^{b}	5.36^{a}	1.669^{c}	1862.0^{bc}	12.28^{a}	0.376^{a}	0.251^{a}	0.366^{a}
2	2	1.00^{b}	0.055^{a}	0.677^{a}	31.61^{a}	0.997^{b}	0.234^{a}	54.81^{b}	36.21^{c}	30.57^{c}	33.50^{a}	10.91^{c}	1.70^{b}	1.371^{cd}	934.3^{d}	8.78^{a}	0.356^{a}	0.275^{a}	0.314^{a}
3		1.20	0.047	0.627	30.89	0.969	0.387	64.44	38.79	32.81	32.64	13.25	3.91	1.817	2003.5	12.62	0.409	0.282	0.330
4	3	1.80^{ab}	0.048^{a}	0.648^{ab}	32.98^{a}	0.982^{b}	0.389^{a}	51.11^{a}	40.72^{ab}	31.46^{bc}	32.95^{a}	10.44^{bc}	2.37^{b}	1.183^{d}	1117.1^{cd}	9.92^{a}	0.329^{a}	0.303^{a}	0.316^{a}
5	4	1.30^{b}	0.047^{a}	0.517^{c}	30.29^{a}	0.951^{b}	0.390^{a}	60.74^{ab}	40.35^{ab}	38.12^{a}	29.59^{a}	21.27^{a}	5.86^{a}	2.278^{a}	2351.7^{a}	11.92^{a}	0.375^{a}	0.265^{a}	0.330^{a}
6	5	1.40^{b}	0.048^{a}	0.538^{bc}	32.01^{a}	0.945^{b}	0.381^{a}	57.77^{b}	40.33^{a}	34.64^{ab}	31.15^{a}	18.64^{a}	7.07^{a}	1.980^{b}	2379.0^{ab}	13.23^{a}	0.379^{a}	0.286^{a}	0.323^{a}
7		0.70	0.050	0.668	31.72	0.682	0.342	57.77	41.26	33.00	28.78	14.39	6.99	1.361	1384.7	10.39	0.388	0.253	0.340
8		2.60	0.051	0.529	30.50	0.948	0.321	60.74	41.69	37.37	28.90	20.88	6.73	1.873	2399.9	12.69	0.390	0.242	0.335
9		2.40	0.054	0.627	31.28	0.951	0.532	56.29	34.58	35.21	28.27	17.43	7.11	1.537	1714.5	9.83	0.374	0.242	0.340
10		2.50	0.058	0.590	31.57	0.940	0.575	42.96	34.74	33.94	29.17	15.58	7.29	1.276	1342.8	9.35	0.361	0.261	0.303
11		1.80	0.051	0.668	30.35	0.923	0.422	60.74	42.69	34.15	29.56	16.01	5.63	1.418	1393.7	9.75	0.337	0.247	0.303
12	5	1.51^{b}	0.094^{a}	0.568^{bc}	30.93^{a}	0.971^{b}	0.344^{a}	55.55^{b}	41.53^{a}	37.41^{ab}	27.75^{a}	20.35^{a}	8.37^{a}	2.029^{b}	2138.6^{ab}	14.30^{a}	0.345^{a}	0.263^{a}	0.320^{a}
13	4	1.51^{b}	0.078^{a}	0.501^{c}	28.54^{a}	0.954^{b}	0.517^{a}	64.44^{ab}	40.41^{ab}	38.40^{a}	30.34^{a}	21.70^{a}	5.96^{a}	2.558^{a}	2677.7^{a}	15.13^{a}	0.367^{a}	0.241^{a}	0.324^{a}
14	2	1.60^{b}	0.087^{a}	0.668^{a}	30.08^{a}	0.990^{b}	0.439^{a}	55.55^{b}	37.14^{c}	30.74^{c}	31.69^{a}	10.50^{c}	2.56^{b}	1.359^{cd}	1091.3^{d}	7.27^{a}	0.342^{a}	0.274^{a}	0.308^{a}
15	1	2.80^{a}	0.065^{a}	0.626^{abc}	31.27^{a}	1.533^{a}	0.374^{a}	42.22^{c}	37.03^{bc}	33.95^{bc}	31.34^{a}	15.23^{b}	5.68^{a}	1.543^{c}	1594.9^{bc}	10.17^{a}	0.367^{a}	0.265^{a}	0.333^{a}
16	3	2.40^{ab}	0.060^{a}	0.627^{ab}	30.70^{a}	0.981^{b}	0.367^{a}	52.59^{a}	40.26^{ab}	32.96^{bc}	34.10^{a}	12.84^{bc}	1.59^{b}	1.224^{d}	1250.0^{cd}	8.35^{a}	0.328^{a}	0.266^{a}	0.318^{a}

Groups: 1 (mixtures 1 and15), 2 (mixtures 2 and 14), 3 (mixtures 4 and 16), 4 (mixtures 5 and 13) and 5 (mixtures 6 and 12). Groups with different letters present significant difference ($p < 0.05$) by Tukey`s test (posthoc). H: moisture content (%); a_w: water activity; BD: bulk density (g/mL); HYG: hygroscopicity (%); WSI: water solubility index; WAI: water absorption index; YE: yield of encapsulation; Tg: glass transition temperature (ºC); TPC: total polyphenol content (mg GAE/100 g); AA: antioxidant activity (µmol TE/g); TBC: total betalain content (mg/g); I: Isorhamnetin (mg/100 g); Q: Quercetin (mg/100 g); K: Kaempferol (mg/100 g); GAE: gallic acid equivalent; TE: trolox equivalent; *L**, *a** and *b** color parameters correspond to resuspended encapsulates.

value for OSA starch (0.52 g/mL) which is one of the carrier agents with high BD value. This could be attributed to the properties acquired by the starch once modified, such as the increase in molecular weight, which allows the material to fill spaces between particles, thus decreasing the occupied volume (Wang *et al*., 2015). To reduce packaging and transportation costs, high BD values are desirable, and BD is related to other encapsulates properties such as flowability, degree of caking, and solubility, which affect product stability (Bicudo *et al*., 2015). Conversely, high protein proportions led to the lowest BD values (Figure 1a), meaning that this material occupies great space even at low quantities, which could be attributed to the denaturalization of protein, which reduces solubility. Mixtures with both carrier agents (OSA starch and WPC) with high FRU values, tended to increase the BD values of the encapsulates due to the high BD of FRU (0.58 g/mL); this result agrees with Sánchez-Madrigal *et al*. (2019), who found that this high BD value is attributed to strongly packed particles occupying less interparticle space.

Hygroscopicity

The encapsulates hygroscopicity ranged from 28.54 to 32.98 (Table 3) and it was significantly ($p < 0.05$) affected by the linear terms of the carrier agents (Table 4). Mixtures with high proportions of WPC presented the lowest values for this response (Figure 1b). This same tendency was observed by Bhusari *et al*. (2014), who attributed this result to the high molecular weight of whey protein, which makes it less hygroscopic. Several studies have reported that betalain stability is influenced by hygroscopicity, and according to the results, there was a negative correlation (R = - 0.587; $p = 0.017$) between hygroscopicity and betalain content. Therefore, lower hygroscopicity values are required to ensure pigment retention.

Water solubility index and Water absorption index

WSI is a crucial parameter of product behavior in the aqueous phase because it determines the reconstitution quality of the encapsulates. The carrier agents showed a significant effect ($p < 0.05$) on WSI, with FRU showing great significance. However, its interaction with OSA starch (β_{13} = - 4.25) had an antagonistic and significant effect (Table 4). WSI values ranged from 0.68 to 1.53 (Table 3), where the higher values corresponded to the encapsulates with high fructan proportions (Figure 1c). This effect was also reported by Sánchez-Madrigal *et al*. (2019) in anthocyanin encapsulation, attributing this behavior to the high concentrations of fructans; the interaction between the particles is promoted and leads to agglomerations that increase the WSI values. The WAI varied from 0.23 to 0.58 (Table 3) and it was not affected ($p > 0.05$) by the carrier agents (Table 4).

Yield of encapsulation

The YE varied from 42.2 to 64.4 % (Table 3). According to the criterion of Jayasundera *et al*. (2011), the YE of most of the treatments evaluated in this study were satisfactory for spray drying at laboratory or pilot scale level. The carrier agents in their linear and interaction terms were affected significantly, and the fitted model explained the data variability in 96.3 % (Table 4). Group 4 (Table 3) with high WPC and OSA starch in a 90:10 proportion conducted to high YE (60 - 64%), while YE decreased with an increase of FRU in the mixture

Table 4. Regression coefficients and correlation of the adjusted model to the experimental data, in the D-optimal mixture design for the physicochemical properties and color parameters of pitaya (*Stenocereus stellatus*) encapsulates.

Tabla 4. Coeficientes de regresión y correlación del modelo ajustado a los datos experimentales en el diseño de mezclas D-óptimo para las propiedades fisicoquímicas y parámetros de color de los encapsulados de pitaya (*Stenocereus stellatus*).

Variable	Linear terms			Non-linear terms				Model	
	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	R^2	*p*-value
Physical properties									
BD	0.511*	0.463*	0.687*	0.316	0.156	0.158	-0.182	0.889	0.007*
WSI	3.34*	0.934*	0.973*	-1.95	-4.25*	0.068	-5.77	0.832	0.004*
WAI	0.949	0.481	0.356	-2.30	-1.74	-0.249	10.67	0.418	0.442
H	9.32*	1.37*	0.972*	-12.1	-13.6	2.43	22.36	0.615	0.116
a_w	-0.196	13.74	7.92	26.83	22.53	2.15	-75.95	0.267	0.763
HYG	25.66*	28.99*	30.58*	18.10	15.87	3.51	-26.92	0.568	0.172
YE	-14.6*	60.1*	51.9*	89.04*	134.3*	30.61*	-227.3*	0.963	< 0.0001*
Tg	9.84	39.01	35.89	75.56*	94.76*	16.62	-360.8*	0.675	0.061
Color parameters									
*L**	32.33*	39.38*	30.28*	-10.77	-4.58	-1.57	76.64	0.865	0.0017*
*a**	33.52	29.77	32.29	8.71	22.57	-0.47	-207.18	0.638	0.0920
*b**	7.35*	23.28*	10.36*	-4.13	-5.73	-3.39	140.16	0.880	0.0010*
ΔE	-2.42*	5.82*	1.86*	7.31	-9.62	5.24	166.44*	0.796	0.0097*
Chemical properties									
TBC	0.89*	2.61*	1.32*	0.413	0.195	-0.970	-3.59	0.968	< 0.0001*
TPC	69.62*	2577.4*	652.2*	2769.1	2664.1	1644.6	-7490.5	0.966	< 0.0001*
AA	-1.24*	13.28*	6.51*	31.60	28.93	9.71	-108.66	0.845	0.0030*
I	0.401	0.354	0.321	-0.142	-0.281	0.226	1.09	0.629	0.100
Q	0.159	0.252	0.271	0.379	0.445	0.0002	-2.03	0.438	0.399
K	0.346	0.321	0.302	-0.004	-0.085	0.071	0.360	0.317	0.660

*Significance ($p < 0.05$). β_1: fructans; β_2: whey protein; β_3: OSA starch; BD: bulk density; WSI: water solubility index; WAI: water absorption index; a_w: water activity; H: moisture content; HYG: hygroscopicity; YE: yield of encapsulation; Tg: glass transition temperature; ΔE: total color difference; TBC: total betalain content; TPC: Total polyphenol content; AA: antioxidant activity; I: isorhamnetin; Q: quercetin; K: kaempferol.

(Figure 1d). Likewise, as observed in Table 4, WPC had the greatest positive effect, followed by OSA starch while FRU had a negative effect on YE. Similar results were reported by Bazaria *et al*. (2016) with the use of WPC, attributing this to a greater solubility of the proteins in the feed solution and the formation of a glassy skin upon drying, preventing the droplets from coalescing and sticking to the wall of the dryer chamber. A similar behavior was obtained with OSA starch (Figure 1d), where contents < 75 % resulted in high YE. On the other hand, FRU resulted in low YE, attributed to their properties, increasing the viscosity of the feed solution favoring the formation of thickening droplets, which are sticky and are attached in the dry chamber (Silva and Meireles, 2015). Low recovery yields using agave fructans as carrier agent in the microencapsulation of strawberry juice were reported by Santiago-García *et al*. (2023).

Glass transition temperature

The Tg of the encapsulates ranged from 34.58 to 42.69 °C (Table 3). Carrier agents did not show significant effect, but the interactions of FRU-WPC, FRU-OSA starch and FRU-WPC-OSA starch were significant (Table 4). The highest Tg values were exhibited by encapsulates with high WPC and OSA starch proportions (Figure 1e). The high Tg values obtained are according to other reports (50.5 – 54 °C) when protein isolates or concentrates are used as carrier agents (Puerta-Gomez and Castell-Perez, 2015). On the other hand, OSA starch has been reported with a high Tg value (Sweedman *et al*., 2013), attributed to the characteristics of hydrophobicity and steric, as well as its highly branched structure leads a molecule with better thermal properties. Borrmann *et al*. (2013) mentioned that OSA starch is a good carrier agent for the encapsulation of passion fruit juice since it increases the Tg. The obtained values are acceptable because under storage they will show good stability, retarding the degradation process.

Color

Table 3 shows the color parameters of the resuspended encapsulates. The *L** parameter, which represents luminosity, was significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents. WPC increased the lightness of the encapsulates compared to FRU and OSA starch (Figure 2a). Similar behavior was reported for betalains in red cactus pear encapsulates (Ruiz-Gutiérrez *et al*., 2014), where β-glucans were used as carrier agents. Furthermore, the *a** parameter was not significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents (Table 4), with values ranging from 27.75 to 33.50, where the highest values corresponded to the resuspended encapsulates with high OSA starch proportions (Figure 2b). This tendency agrees with Lacerda *et al*. (2016), in jussara pulp microparticles produced with mixtures containing high proportions of OSA starch, which presented higher *a** values. The *b** parameter (- blue/ + yellow) values ranged from 10.44 to 21.70 and the carrier agents in their linear terms had a significant ($p < 0.05$) effect in this response (Table 4). These high values are attributed to the fact that the pitaya juice was obtained from raw material composed of a significant proportion of orange pitaya (46 %), which is related to high BX content. High WPC proportions produced resuspended encapsulates with high *b** values (Figure 2c) as is shown in Table 4. In comparison with other studies, the *b** values reported by Ruiz-Gutiérrez *et al*. (2014) and Robert *et al*. (2015) in cactus pear juice encapsulation are negative, leading to bluish tones, while in this study *b** values were positive, and the encapsulates resuspended tended to yellowish tones, due to the high orange pitaya proportions. Additionally, the total color difference (*ΔE*) was significantly affected ($p < 0.05$) by the linear terms of each carrier agent and also by the interaction of FRU, WPC, and OSA starch (β_{123}) (Table 4). ΔE values ranged from 1.59 to 8.37, where the lowest values corresponded to the mixtures with high OSA starch proportions (Figure 2d). These low *ΔE* values are considered acceptable, representing minimal differences between the sample and the control (Nkhata, 2020), in this case, before and after spray-drying.

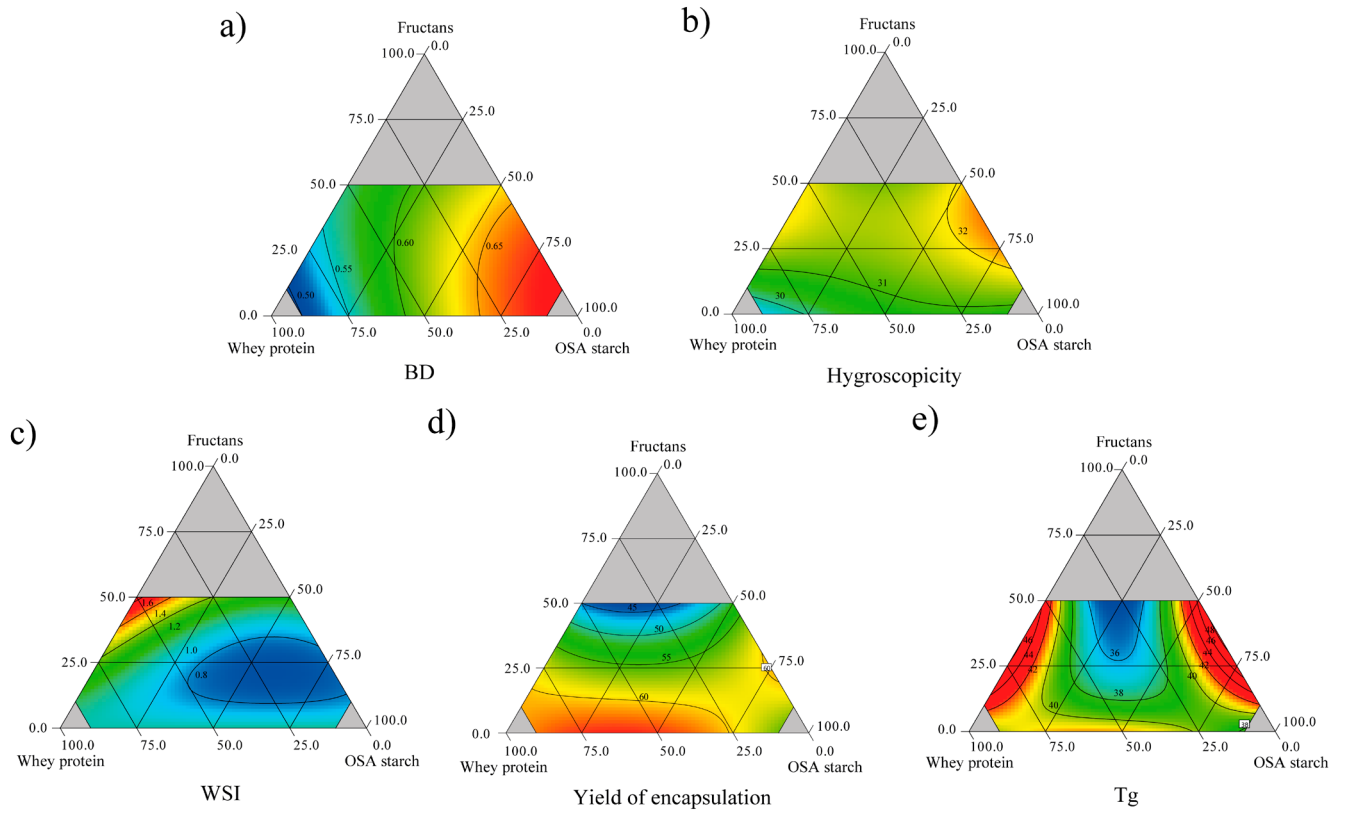


Figure 1. Contour plots showing the effect of carrier agents on (a) bulk density (BD), (b) hygroscopicity, (c) water solubility index (WSI), (d) yield of encapsulation, and (e) glass transition temperature (Tg) of pitaya encapsulates.
Figura 1. Gráficos de contorno que muestra el efecto de los agentes acarreadores sobre (a) densidad aparente (BD), (b) higroscopicidad, (c) índice de solubilidad en agua (WSI), (d) rendimiento de encapsulación y (e) temperatura de transición vítrea (Tg) de los encapsulados de pitaya.

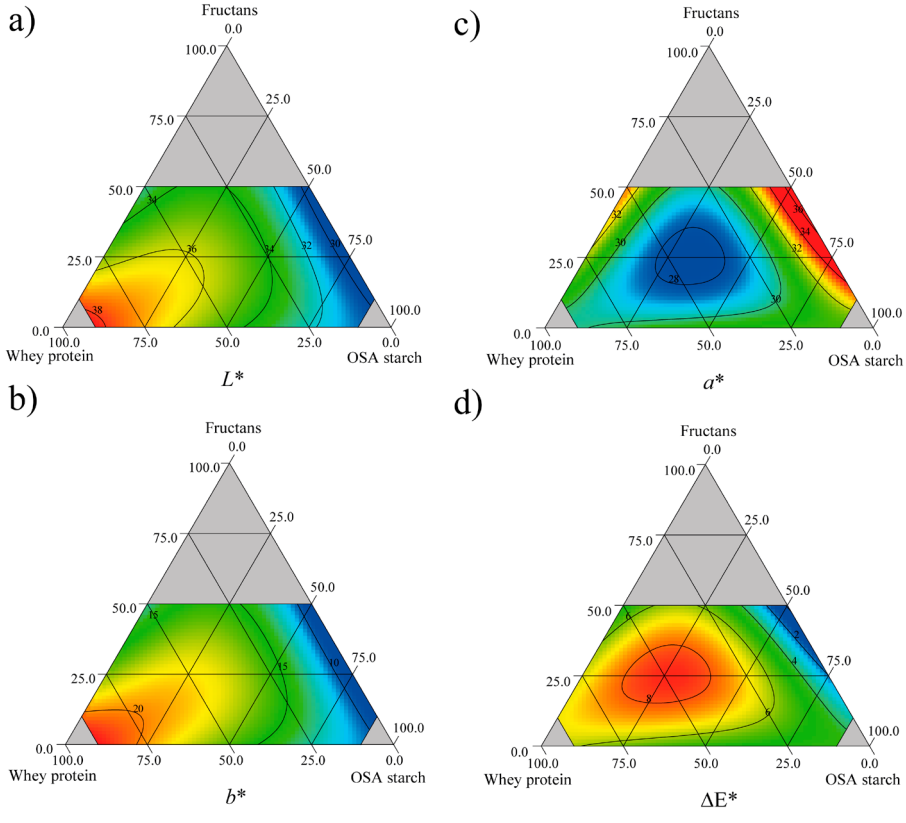


Figure 2. Contour plots of color properties of resuspended pitaya (*Stenocereus stellatus*) encapsulates prepared using the mixtures of fructans, whey protein, and OSA starch, as carrier agents. (a) *L**, (b) *a**, (c) *b**, and (d) total color difference (ΔE).
Figura 2. Gráficos de contorno de las propiedades de color de los encapsulados de pitaya (*Stenocereus stellatus*) resuspendidos preparados utilizando mezclas de fructanos, proteína de suero y almidón OSA como agentes acarreadores. (a) *L**, (b) *a**, (c) *b** y (d) diferencia total de color (ΔE).

Morphological properties

The SEM results for the pitaya encapsulates are shown in Figure 3. In general, the micrographs showed spherical shapes for all mixtures with collapsed or compressed structures and agglomeration between particles. The particle size varied between 55 and 67 µm, and most of the microcapsules showed porous surfaces. To describe the individual effect of each carrier agent on the encapsulates, a comparison of the carrier agent's micrographs as controls was made. The control of fructans (Figure 3a), resulted in a complete structure and smoother surfaces. This agrees with do Carmo *et al*. (2018), who reported that inulin showed more regular surfaces in beetroot microcapsules due to its hygroscopic characteristics. In contrast, encapsulates with decreasing FRU proportions and increasing WPC resulted in capsules with cracks and collapsed or compressed structures (Figures 3b, c). This can be corroborated in the encapsulates with high protein proportions (Figures 3b, 3d, and 3e) and with the WPC control (Figure 3f) where compressed and irregular microcapsules with cavities on the surface are observed. Similar results were reported by Mahdi *et al*. (2020) and Premi and Sharma (2017), who related these results with the viscoelastic properties and the film-forming capacity of these materials as well as the partial denaturalization of protein molecules during the drying process. Regarding the OSA starch, the control of this carrier agent (Figure 3g) shows a complete structure with a slight contraction. Similar findings were reported by Wang *et al*. (2017) during the encapsulation of chili seed oil using OSA starch as a carrier agent, reporting less surface damage. However, when they mixed OSA starch with other wall materials (gelatin and soybean protein) resulted in rupture of the microcapsules surface, which agrees with the obtained results for the encapsulates with OSA starch and WPC (Figures 3h and 3d) with cracks and fissures. When the carried agents are in similar proportions the encapsulate resulted with an irregular morphology with slight contraction in its structure (Figure 3i).

Total polyphenol content

The chemical characteristics of the pitaya encapsulates are shown in Table 3. The TPC ranged from 934.33 to 2677.74 mg GAE/100 g d.b. The carrier agents significantly ($p < 0.05$) affected the TPC in their linear terms, and the proposed model described 96.6 % of the data variability (Table 4). The highest

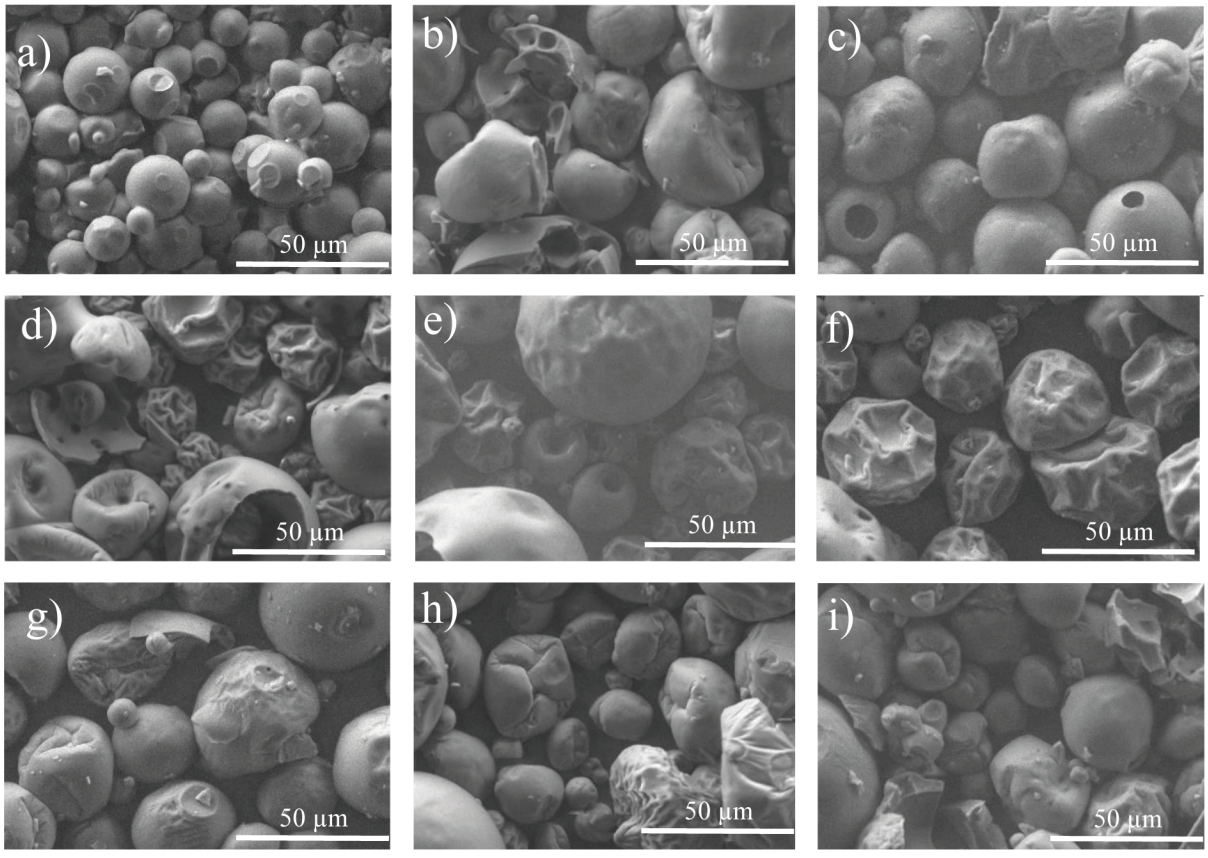


Figure 3. Morphology of carrier agents (controls) and pitaya (*Stenocereus stellatus*) encapsulates prepared with different mixtures of fructan (FRU), whey protein concentrate (WPC), and OSA starch (OSA), as carrier agents (%). (a) FRU-Control, (b) 24.7 FRU-65.3WPC-10 OSA, (c) 50 FRU-39.7 WPC-10.3 OSA, (d) 0 FRU-50 WPC-50 OSA, (e) 0 FRU-90 WPC-10 OSA, (f) WPC-Control, (g) OSA-Control, (h) 0 FRU-24.9 WPC-75.1 OSA, (i) 27.5 FRU-37.8 WPC-34.7 OSA.

Figura 3. Morfología de los agentes acarreadores (controles) y de los encapsulados de pitaya (*Stenocereus stellatus*) preparados con diferentes mezclas de fructanos (FRU), concentrado de proteína de suero (WPC) y almidón OSA (OSA) como agentes acarreadores (%). (a) FRU-Control, (b) 24.7 FRU-65.3WPC-10 OSA, (c) 50 FRU-39.7 WPC-10.3 OSA, (d) 0 FRU-50 WPC-50 OSA, (e) 0 FRU-90 WPC-10 OSA, (f) WPC-Control, (g) OSA-Control, (h) 0 FRU-24.9 WPC-75.1 OSA, (i) 27.5 FRU-37.8 WPC-34.7 OSA.

values corresponded to pitaya juice encapsulated with high protein mixtures, as shown in Figure 4a. This correlates with group 5 (24.7 % FRU:65.3 % WPC:10 % OSA starch) and mixture 8 (3.3 % FRU:68.4 % WPC:28.3 % OSA starch), both observed in Table 3. This can be attributed to the ability of the protein to form thermally permanent gels above 70 °C, minimizing the degradation of phenolic compounds (Bartkowiak *et al*., 2017). This agrees with the data reported by Bazaria and Kumar (2016) and Bhusari *et al*. (2014), for the encapsulation of beetroot juice and tamarind pulp, respectively. They attributed this to the formation of a glassy skin due to the surface-active properties of the protein. Similar findings were reported by Ben Sassi *et al*. (2020), who evaluated protein and carbohydrates as wall materials, where the protein showed better efficiency because of their stronger interaction with phenolic compounds by hydrophobic and non-covalent hydrogen bonds.

Comparing the juice phenolic content (679.26 mg GAE/100 g d.b.) and the content from the encapsulates with high protein proportions, a four-fold increase (1714.52-2726.89 mg GAE/100 g d.b.) was observed. This was also reported by Robert *et al*. (2015) where the cactus pear juice had 73.2 mg GAE/100 g and a three-fold increase was obtained in the encapsulates (231 mg GAE/100 g). On the other hand, the lowest TPC values were obtained for the mixtures with greater proportions of OSA starch (Figure 4a). This agrees with the results of da Silva *et al*. (2013) after the encapsulation of propolis with gum arabic and OSA starch, where they reported that the former achieved better preservation of phenolic compounds than OSA starch. On the other hand, it has been reported that mixtures with high fructan content decreased TPC in the encapsulation of blue corn extracts (Sánchez-Madrigal *et al*., 2019).

Antioxidant activity

The AA ranged from 7.27 to 15.13 µmol TE/g (Table 3). AA was significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents, and the proposed model describes the data variability at 84.5 % (Table 4). WPC exhibited the greatest positive effect, whereas FRU had a negative effect, indicating less AA with an increase in this material (Figure 4b). This can be related to protein denaturation during the drying process, which releases bioactive peptides and the formation of complexes by protein-sugar interactions. Similar results were reported for the encapsulation of beetroot juice, where higher antioxidant activity was obtained by whey protein alone and in combination with either maltodextrin or inulin (do Carmo *et al*., 2018). This was attributed to the products of the Maillard reaction due to the possible interaction of the protein with the sugars from the juice at high temperatures during the spray drying, resulting in the formation of compounds like nitrogenated heterocycles and melanoidins, which have been associated with antioxidant activity (Ke and Li, 2023). Comparing the polyphenol content and the antioxidant activity in this study, both were higher as the protein proportion increased (Table 3). The same occurred in the study by Bazaria and Kumar

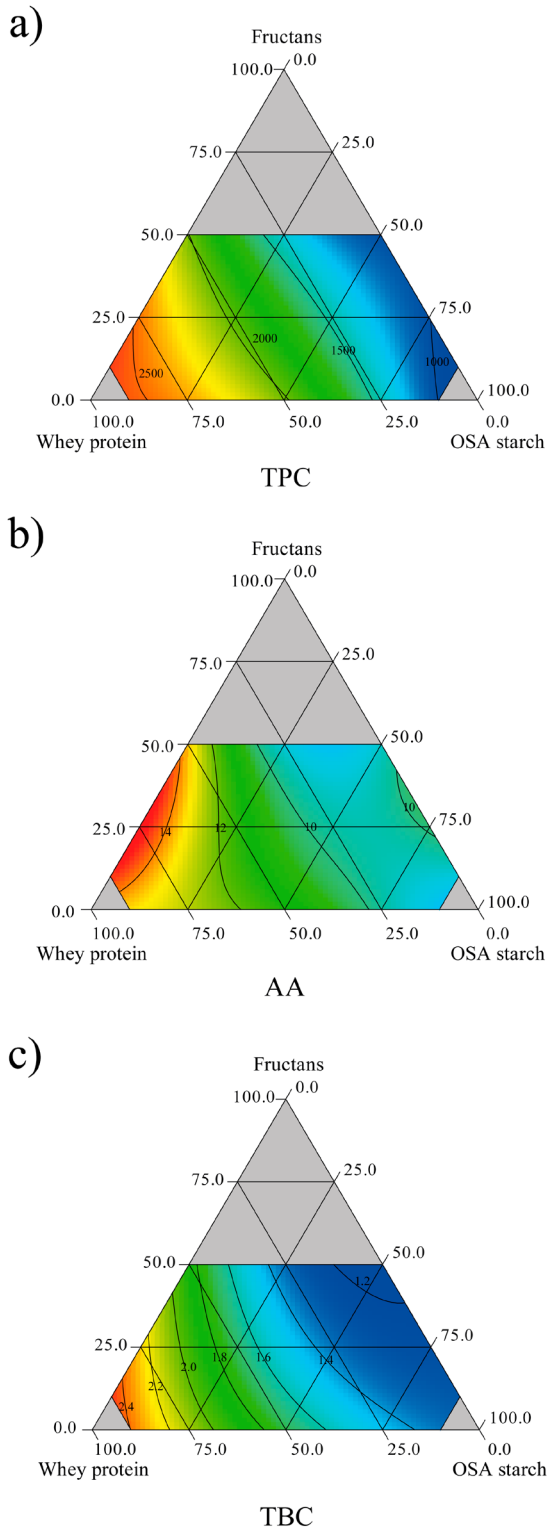


Figure 4. Chemical properties of pitaya (*Stenocereus stellatus*) encapsulates prepared using the mixtures of fructans, whey protein, and OSA starch, as carrier agents. (a) total polyphenol content, (b) antioxidant activity, (c) total betalain content.
Figura 4. Propiedades químicas de los encapsulados de pitaya (*Stenocereus stellatus*) preparados utilizando mezclas de fructanos, proteína de suero y almidón OSA como agentes acarreadores. (a) contenido de polifenoles totales, (b) actividad antioxidante, (c) contenido de betalaínas totales.

(2016), where a gradual increase in the concentration of whey protein promoted the content of polyphenols and, therefore, increased the antioxidant activity in beet encapsulates due to the emulsifying and gelling properties of protein.

Flavonoid content

The individual flavonoid content was not significantly ($p > 0.05$) affected by any of the carrier agents (Table 4). The contents of isorhamnetin, quercetin, and kaempferol in the encapsulates are shown in Table 3. These values showed an evident decrease in contrast to pitaya juice, resulting in an average retention percentage of 32.51 % for isorhamnetin, 24.77 % for quercetin, and 13.78 % for kaempferol. These retentions were lower than those reported in red cactus pear encapsulates (Ruiz-Gutiérrez *et al*., 2014).

Total betalain content

One of the main properties of encapsulates is their pigment content. TBC was significantly ($p < 0.05$) affected by the carrier agents in their linear effect, and the proposed model was adjusted successfully to describe the data variability by 96.8 % (Table 4). Values for TBC ranged from 1.18 to 2.56 mg/g (Table 3). TBC increased as the WPC proportion increased in the mixtures, as shown in Figure 4c. For most mixtures, TBC was close to TBC in pitaya juice, obtaining a minimum retention of 71 %. However, the increase of protein in the mixtures could increase TBC of some encapsulates. This same trend has been reported for the encapsulation of cactus pear juice, with soybean protein isolates alone and blended with maltodextrin or inulin (Robert *et al*., 2015). They attributed this behavior to the cationic features of betalains promoting betalain-polymer interactions because of electrostatic interactions or hydrogen bonding. In addition, Adhikari *et al*. (2009) reported that whey protein isolate forms a film around the particles immediately after contacting the drying air, even faster than other carrier agents. Low betalain content was exhibited by encapsulates with high FRU and OSA starch proportions; however, in comparison with the results of Vergara *et al*. (2014) and Vargas-Campos *et al*. (2018), who used OSA starch as a carrier agent, the TBC values were higher. This suggests that the combined use of WPC, FRU, and OSA starch, as is observed in group 5 (24.7 % FRU:65.3 % WPC:10 % OSA starch) could enhance betalain contents (Table 3). Additionally, the betalain and polyphenol content, and the antioxidant activity of the pitaya encapsulates showed the same behavior. According to the Pearson´s analysis these results showed a strong correlation between TBC ($R = 0.828$; $p = 0.0001$) and TPC ($R = 0.829$; $p = 0.0001$) with AA.

Optimization of carrier agents for pitaya encapsulates

The optimization was based in obtaining pitaya encapsulates with appropriate physicochemical characteristics. Only responses with a significant fit ($p < 0.05$) to the proposed model and without a lack of fit were considered. A maximum of TBC, TPC, AA, YE, and b^* parameter values, keeping the other properties in range, was the criterion to find the optimum proportions of carrier agents. According to the response optimizer, the optimal mixture consisted of 7.1 % FRU, 82.9 % WPC, and 10 % OSA starch, with a desirability score of 0.865. The resulting encapsulates showed values of 2.28 mg/g for TBC, 2481.72 mg GAE/100 g for AA, 13.8 µmol TE/g for TPC, 61.42 % for YE and 21.12 for the b^* parameter.

CONCLUSIONS

The D-optimal mixture design was adequate to optimize the proportions of FRU, WPC, and OSA starch as carrier agents, on the physicochemical properties of encapsulated pitaya juice by spray drying. The combination of carbohydrates and proteins resulted in acceptable physicochemical properties of the encapsulates. Moreover, mixtures with high proportions of WPC improved the yield of encapsulation, betalain content and antioxidant activity. Similarly, the TPC showed a four-fold increase in comparison with pitaya juice. However, the color of the resuspended powders was affected by the whitening effect of the WPC, but increased the b^* parameter of color related to the higher BX content of the pitaya juice used. The optimized mixture of carrier agents for pitaya juice encapsulation (7.1 % FRU, 82.9 % WPC, and 10 % OSA starch) revealed acceptable physicochemical characteristics. These results suggest that the materials evaluated in this study present a good alternative to improve the pigment preservation of pitaya juice with a possible application in the development of food products with antioxidant properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Mexican National Council of Humanities, Science and Technology (CONAHCYT) for support this research through the grant conceded to María Aurora Soto Dagnino.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest related to this article.

REFERENCES

Adhikari, B., Howes, T., Wood, B.J., and Bhandari, B.R. 2009. The effect of low molecular weight surfactants and proteins on surface stickiness of sucrose during powder formation through spray drying. Journal of Food Engineering. 94(2): 135-143.

Amchova, P., Kotolova, H., and Ruda-Kucerova, J. 2015. Health safety issues of synthetic food colorants. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 73(3): 914-922.

Anderson, R.A., Conway, H.F., and Peplinski, A.J. 1970. Gelatinization of corn grits by roll cooking, extrusion cooking and steaming. Starch – Starke. 22(4): 130-135.

Association of Official Analytical Chemist– _AOAC. 1998. In *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (15th ed.). Washington: AOAC International.

Bartkowiak, A., Krawczyn, W., and Federowicz, A. 2017. Stability of nutraceutical compounds encapsulated with modified

polymers and additives to protect bioactive substances applied in spray-drying. In New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds. J.C. Ruíz-Ruíz, and M.R. Segura-Campos (ed.), pp 99-120. Wiley, West Sussex, UK.

Bazaria, B., and Kumar, P. 2016. Effect of whey protein concentrate as drying aid and drying parameters on physicochemical and functional properties of spray dried beetroot juice concentrate. Food Bioscience. 14: 21-27.

Ben Sassi, C., Marcet, I., Rendueles, M., Díaz, M., and Fattouch, S. 2020. Egg yolk protein as a novel wall material used together with gum Arabic to encapsulate polyphenols extracted from *Phoenix dactylifera* L. pits. LWT.- Food Science and Technology. 131: 109778.

Bhusari, S.N., Muzaffar, K., and Kumar, P. 2014. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. Powder Technology. 266: 354-364.

Bicudo, M.O.P., Jó, J., de Oliveira, G.A., Chaimsohn, F.P., Sierakowski, M.R., de Freitas, R.A., and Ribani, R.H. 2015. Microencapsulation of Juçara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different carriers and drying temperatures. Drying Technology. 33(2): 153-161.

Borrmann, D., Pierucci, A.P.T.R., Leite, S.G.F., and da Rocha Leão, M.H.M. 2013. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. Food and Bioproducts Processing. 91(1): 23-27.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 28: 25-30.

Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., and Corke, H. 1998. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(6): 2063-2070.

Cai, Y.Z., and Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. Journal of Food Science. 65(7): 1248-1252.

Castellanos-Santiago, E., and Yahia, E.M. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(14): 5758-5764.

da Silva, F.C., Da Fonseca, C.R., De Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P., and Favaro-Trindade, C.S. 2013. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. Food and Bioproducts Processing. 91(1): 28-36.

do Carmo, E.L., Teodoro, R.A.R., Félix, P.H.C., Fernandes, R.V., de Oliveira, É.R., Veiga, T.R.L.A., Borges, S.V., and Botrel, D.A. 2018. Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. Food Chemistry. 249: 51-59.

de Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., and Botrel, D.A. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. Carbohydrate Polymers. 101(1): 524-532.

Fang, Z., and Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols - A review. Trends in Food Science and Technology. 21(10): 510-523.

García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., and Joaquín-Cruz, E. 2013. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. Plant Foods for Human Nutrition. 68(4): 403-410.

García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., and Salinas-Moreno, Y. 2017. Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. Pruinosus* and *S. stellatus*). Food Chemistry. 234: 111-118.

Gengatharan, A., Dykes, G.A., and Choo, W.S. 2015. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. LWT- Food Science and Technology. 64(2): 645-649.

Hussain, E.A., Sadiq, Z., and Zia-Ul-Haq, M. 2018. Sources of Betalains. In Betalains: Biomolecular Aspects. Eds: E.A. Hussain, Z. Sadiq and M. Zia-Ul-Haq (ed.), pp 15-32. Springer Nature. Cham, Switzerland.

Jayasundera, M., Adhikari, B., Howes, T., and Aldred, P. 2011. Surface protein coverage and its implications on spray-drying of model sugar-rich foods: Solubility, powder production and characterisation. Food Chemistry. 128(4): 1003-1016.

Ke, C., and Li, L. 2023. Influence mechanism of polysaccharides induced Maillard reaction on plant proteins structure and functional properties: A review. Carbohydrate Polymers. 302: 120430.

Kim, H.J., Choi, H.K., Moon, J.Y., Kim, Y.S., Mosaddik, A., and Cho, S.K. 2011. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. Journal of Food Science. 76(1): 1-8.

Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., and Sarbatly, R. 2014. A critical review on the spray drying of fruit extract: Effect of additives on physicochemical properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54(4): 449-473.

Kuti, J. 2004. Antioxidants compounds from four opuntia cactus pear fruit varieties. Food chemistry. 85: 527-533.

Lacerda, E.C.Q., Calado, V.M.D.A., Monteiro, M., Finotelli, P.V., Torres, A.G., and Perrone, D. 2016. Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. Carbohydrate Polymers. 151: 500-510.

Mahdi, A.A., Mohammed, J.K., Al-Ansi, W., Ghaleb, A.D.S., Al-Maqtari, Q.A., Ma, M., Ahmed, M.I., and Wang, H. 2020. Microencapsulation of fingered citron extract with gum arabic, modified starch, whey protein, and maltodextrin using spray drying. International Journal of Biological Macromolecules. 152: 1125-1134.

Mehran, M., Masoum, S., and Memarzadeh, M. 2020. Improvement of thermal stability and antioxidant activity of anthocyanins of *Echium amoenum* petal using maltodextrin/modified starch combination as wall material. International Journal of Biological Macromolecules. 148: 768-776.

Nkhata, S.G. 2020. Total color change (ΔE*) is a poor estimator of total carotenoids lost during post-harvest storage of biofortified maize grains. Heliyon. 6(10): e05173.

Pérez-Loredo, M.G., García-Ochoa, F., and Barragán-Huerta, B.E. 2016. Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. International Journal of Food Properties. 19(2): 326.

Premi, M., and Sharma, H.K. 2017. Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. International Journal of Biological Macromolecules. 105: 1232-1240.

Puerta-Gomez, A.F., and Castell-Perez, M.E. 2015. Physical stability of octenyl succinate-modified polysaccharides and whey proteins for potential use as bioactive carriers in food systems. Journal of Food Science. 80(6): E1209-E1217.

Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., and Sáenz, C. 2015. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. LWT -Food Science and Technology. 60(2): 1039-1045.

Ruiz-Gutiérrez, M.G., Amaya-Guerra, C.A., Quintero-Ramos, A., Ruiz-Anchondo, T.d.J., Gutiérrez-Uribe, J.A., Baez-González, J.G., Lardizabal-Gutiérrez, D., and Campos-Venegas, K. 2014. Effect of soluble fiber on the physicochemical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) encapsulated using spray drying. Food Science and Biotechnology. 23(3): 755-763.

Sánchez-Madrigal, M.Á., Quintero-Ramos, A., Amaya-Guerra, C.A., Meléndez-Pizarro, C.O., Castillo-Hernández, S.L., and Aguilera-González, C.J. 2019. Effect of agave fructans as carrier on the encapsulation of blue corn anthocyanins by spray drying. Foods. 8(7): 268.

Santiago-García, P.A., León-Martínez, F.M., Gutiérrez, M.C., Aguirre-Loredo, R.Y., Santiago-Urbina, J.A., and Soto-Castro, D. 2023. Microencapsulation of strawberry juice in *Agave angustifolia* fructans: effect of spray-drying conditions on the anthocyanin content and physicochemical properties. International Journal of Food Science & Technology. 58(12): 6725-6735.

Sharma, V., McKone, H.T., and Markow, P.G. 2011. A global perspective on the history, use, and identification of synthetic food dyes. Journal of Chemical Education. 88(1): 24-28.

Shishir, M.R.I., and Chen, W. 2017. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. Trends in Food Science and Technology 65: 49-67.

Silva, E.K., and Meireles, M.A.A. 2015. Influence of the degree of inulin polymerization on the ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil. Carbohydrate Polymers. 133: 578-586.

Souza, A.L.R., Hidalgo-Chávez, D.W., Pontes, S.M., Gomes, F.S., Cabral, L.M.C., and Tonon, R.V. 2018. Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. LWT - Food Science and Technology. 91: 286-292.

Sweedman, M.C., Tizzotti, M.J., Schäfer, C., and Gilbert, R.G. 2013. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: a review. Carbohydrate Polymers, 92(1): 905-920.

Tabio-García, D., Paraguay-Delgado, F., Gutiérrez, D.L., Quintero-Ramos, A., Meléndez-Pizarro, C.O., Ochoa-Martínez, L.A., Sánchez-Madrigal, M.Á, Ruiz-Gutiérrez, M.G., and Espinoza-Hicks, J.C. 2023. Effectiveness of *Opuntia ficus-indica* mucilage as a carrier agent in microencapsulation of bioactive compounds of *Amaranthus hypochondriacus* var. Nutrisol. Food Bioscience. 52: 102368.

Vargas-Campos, L., Valle-Guadarrama, S., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., Lobato-Calleros, C., and Calvo-López, A.D. 2018. Encapsulation and pigmenting potential of betalains of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. Journal of Food Science and Technology. 55(7): 2436-2445.

Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., and Robert, P. 2014. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. Food Chemistry. 157: 246-251.

Wang, X., Yuan, Y., and Yue, T. 2015. The application of starch-based ingredients in flavor encapsulation. Starch/Staerke. 67(3–4): 225-236.

Wang, Y., Liu, B., Wen, X., Li, M., Wang, K., and Ni, Y. 2017. Quality analysis and microencapsulation of chili seed oil by spray drying with starch sodium octenylsuccinate and maltodextrin. Powder Technology. 312: 294-298.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Polimorfismo del gen PAPPA2 asociado con la fertilidad postparto en vacas lecheras de raza Holstein manejadas bajo condiciones cálidas en el sur de Sonora México

Polimorphism in the PAPPA2 gene associated with postpartum fertility in Holstein milking cows managed under warm conditions in southern Sonora Mexico

Pablo Luna-Nevárez[1], Isabel Álvarez-Tavares[1], José Torres Simental[1], José Leyva-Corona[1], Juan F. Medrano[2], Milton G. Thomas[3], Ricardo Zamorano-Algandar[4], Manuel Nieblas-López[4]*

[1] Depto. de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, Son., 85000, Mex.
[2] Department of Animal Science, University of California, Davis, CA 95616, USA.
[3] Texas A&M AgriLife Research, Beeville, TX 78102, USA.
[4] Depto. de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Hermosillo, Son., 83000, Mex.

ABSTRACT

Reproductive management in dairy cows in southern Sonora is a challenge due to the characteristic hot climate, thus, genetic selection for fertility is desirable. Our objective was to study the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) from the PAPPA2 gene and postpartum fertility traits in lactating Holstein cows. A total of 362 cows were included in this study. Individual blood samples were collected on FTA cards, which were used for DNA extraction and genotyping of two PAPPA2 gene SNPs. An associative study was then performed between the genotypes of the SNPs and postpartum reproductive traits using a statistical mixed-effects model. Only the SNP rs109952914 was associated with all fertility traits and retained for allele substitution analysis. The favorable allele of the SNP rs109952914 was the T allele ($P < 0.05$), as it increased the percentage of pregnancy at first service (+ 12.60), and reduced services per conception (- 0.16) and days open (- 19.52). In conclusion, a SNP within the PAPPA2 gene was a predictor of postpartum fertility in Holstein dairy cows; then, it was recommended to be used as genetic marker in animal breeding programs to increase reproductive efficiency in Holstein dairy cattle managed under warm environmental conditions.

Keywords: dairy cattle; DNA; hot climate; reproduction; SNP.

RESUMEN

El manejo reproductivo en vacas lecheras en el sur de Sonora es un reto debido al clima cálido característico, por lo que la selección genética para fertilidad es deseable. El objetivo fue estudiar la asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen PAPPA2 y caracteres de fertilidad postparto en vacas Holstein lactantes. Un total de 362 vacas fueron incluidas en el estudio. Muestras de sangre individuales fueron recolectadas y vaciadas en tarjetas FTA, las cuales fueron usadas para la extracción de ADN y genotipificación de dos SNPs del gen PAPPA2. Posteriormente se realizó un estudio asociativo entre los genotipos de los SNPs y caracteres reproductivos postparto, usando un modelo estadístico de efectos mixtos. Sólo el SNP rs109952914 se asoció con todos los rasgos reproductivos estudiados por lo que fue retenido para el análisis de substitución alélica. El alelo favorable del SNP rs109952914 fue el alelo T ($P < 0.05$), ya que éste aumentó el porcentaje de preñez a primer servicio (+12.60), y redujo los servicios por concepción (-0.16) y los días abiertos (-19.52). En conclusión, un SNP dentro del gen PAPPA2 resultó ser predictor de la fertilidad postparto, por lo cual se recomienda usarlo como marcador genético en programas de mejoramiento animal para incrementar la eficiencia reproductiva en vacas Holstein expuestas a condiciones ambientales cálidas.

Palabras clave: ADN; clima caluroso; reproducción; SNP; ganado lechero.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Sonora los establos lecheros tecnificados alcanzan una producción total de leche que rebasa los 310 mil litros al día (SAGARPA, 2020). Dentro de estos sistemas productivos, la fertilidad representa un factor de suma importancia para alcanzar los altos volúmenes de leche requeridos para asegurar su rentabilidad (Zamorano-Algandar *et al*., 2021).

El período de manejo reproductivo e inseminación artificial en ganado lechero en regiones cálidas inicia el mes de enero y se extiende hasta mayo y junio, sin embargo, la fertilidad empieza a decrecer a medida que avanza el verano. Lo anterior es debido a las condiciones ambientales extremas que causan estrés por calor (EC), y que son típicas de la época de verano en el sur de Sonora (Rivera-Acuña *et al*., 2015). Los parámetros de fertilidad en establos lecheros de esta región son eficientes durante invierno y primavera llegando hasta el 80 %, pero decrecen a medida que se intensifican las condiciones climáticas cálidas resultando en un descenso en las tasas de gestación por debajo del 50 % (Leyva-Corona *et al*., 2018).

Debido a la exposición ambiental en la época de verano, el ganado bovino lechero muestra una elevación en su

*Autor para correspondencia: Manuel Nieblas-López
Correo-e: manuel.nieblas@unison.mx
Recibido: 20 de febrero de 2024
Aceptado: 1 de noviembre de 2024
Publicado: 06 de diciembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2261

temperatura basal corporal y en su tasa respiratoria, que son alteraciones homeotérmicas que resultan del sistema de regulación térmica (West, 2003). Sin embargo, lo anterior ocasiona una reducción en el consumo de alimento, así como inmunodepresión y alteraciones metabólicas y endócrinas que comprometen seriamente la fertilidad y el rendimiento productivo (Hansen *et al*., 2001).

Diversos manejos se han propuesto para disminuir el efecto adverso del estrés calórico y mejorar la fertilidad en vacas lecheras durante el verano, tales como cambios en la alimentación y adecuaciones en las instalaciones (Tresoldi *et al*., 2018; Del Río-Avilés *et al*., 2022). Sin embargo, dichas estrategias son costosas y poco accesibles para los productores de ganado lechero (Zamorano-Algandar *et al*., 2021).

Actualmente, la aplicación de tecnologías moleculares se ha convertido en una importante herramienta para el descubrimiento de genes asociados a rasgos económicamente importantes, tales como la tolerancia al estrés por calor la cual influye favorablemente en la producción animal (Proaño-Morales *et al*., 2021). La integración de áreas como la genómica y la selección de genotipos en el ganado según su adaptabilidad, son estrategias favorables para que los sistemas de producción de leche subsistan ante las preocupantes proyecciones demográficas y climáticas (Yodklaew *et al*., 2017).

Genes pertenecientes al eje metabólico de la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1) han sido reportados como asociados a rasgos reproductivos en bovinos (Angulo - Valenzuela *et al.,* 2021). Dichos genes se localizan dentro del cromosoma 5 (BTA5) e incluyen, ademas del IGF1, STAT5 (Transductor de señales y activador de transcripción tipo-5), SOCS2 (Supresor de señales de citoquinas tipo-2) y PMCH (Hormona propio-melanocortina). Estos genes son considerados como candidatos potenciales para estudios de fertilidad en ganado (Leyva- Corona *et al*., 2018).

Interesantemente, el gen PAPPA2 (Proteína plasmática asociada a la preñez tipo-2) ubicado en el cromosoma bovino 20 (BTA20), ha sido reportado como marcador genético de los caracteres de facilidad al parto y vida productiva en vacas Holstein (Wickramasinghe *et al*., 2011), así como de las variables reproductivas de edad al primer y segundo parto en bovinos de la raza Romosinuano, por lo que parece estar asociado al eje metabólico GH/IGF1 (Luna-Nevarez *et al*., 2012). La proteina codificada por el gen PAPPA2 es considerada como biomarcador durante la gestación, y se expresa en ratones y humanos en tejidos reproductivos como ovarios, placenta, embrión y feto (Wang *et al*., 2008). Recientemente, Zhao *et al.* (2022) reportaron polimorfismos del gen PAPPA2 asociados a rasgos reproductivos en cerdos tales como tamaño de la camada y número total de nacidos.

Por lo tanto, el objetivo fue evaluar la asociación de 2 polimorfismos del gen PAPPA2 con los caracteres reproductivos postparto de tasa de preñez a primer servicio, número de servicios por concepción y días abiertos en vacas lecheras Holstein manejadas en un clima cálido.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Comité de Ética del Instituto Tecnológico de Sonora aprobó los protocolos experimentales y procesos establecidos para el manejo del ganado bovino incluido en este estudio (Código de registro 2019_0108).

Sitio experimental

La presente investigación se realizó en dos establos lecheros localizados en el Valle del Yaqui, en el sur del estado de Sonora, durante el período del 15 de marzo al 15 de junio. La ubicación geográfica se sitúa en las coordenadas de 27°22´04" de Latitud Norte y 109°53´09" de Longitud Oeste, a una altura de 20 metros promedio sobre el nivel del mar. El clima existente varía de seco a semi-húmedo, y se caracteriza por temperaturas anuales que promedian una máxima de 33.6°C y una mínima de 17.4°C, con una precipitación anual promedio de 520.1 mm.

Animales y manejo

El estudio incluyó 362 vacas de raza Holstein lactantes, de 3 a 5 partos, con un promedio de 122.30 ± 8.60 días en leche y una condición corporal de 2.5 a 3.5 (escala del 1 al 5 donde 1 = emaciada y 5 = obesa). Un total de 86 sementales y 226 vacas de raza Holstein formaron parte del pedigree. La compañía distribuidora de semen proporcionó la información referente al número de hijas y los registros genéticos (PTAs) por semental, mientras que los establos participantes en el estudio proporcionaron los registros productivos y reproductivos por vaca.

Las vacas se alojaron en corrales con sombra y libre acceso a bebederos. Se les ofreció una dieta alimenticia consistente en 45 % de heno de alfalfa, 20 % de ensilaje de maiz y 35 % de concentrado energético comercial, para cubrir los requerimientos nutricionales recomendados por el NRC para ganado lechero en lactación, con peso promedio de 650 kg y producción aproximada de 30 kg/d de leche. La composición promedio de la dieta incluyó 5.0 % de grasa y 17.5 % de proteína.

La producción de leche se determinó durante la ordeña realizada dos veces al día (5 am y 5 pm), para lo cual se utilizó un sistema de pesaje electrónico con escala de 0 a 40 kg (Metatron 21, Westfalia Surge, México, S.A. de C.V., Aguascalientes, MX) integrado al sistema de ordeño. Además, se realizó en forma periódica el diagnóstico de mastitis subclínica a través de la prueba de California en muestras de leche.

Después del período de partos previo, el cual ocurrió en la época de primavera, las vacas fueron revisadas con equipo de ultrasonografía a los días 30, 45 y 60 postparto para determinar el grado de involución uterina y de desarrollo folicular ovárico. A los 60 días posteriores al parto, se inició un tratamiento hormonal para la sincronización de la ovulación en todas las vacas includidas en el estudio (n = 362), que consistió en la aplicación intramuscular (IM) de 100 µg de GnRH, más 25 mg de PGF2α una semana despues, y una segunda aplicación de 100 µg de GnRH a las 48 h posteriores.

Al siguiente día se realizó la técnica recto-cervical de inseminación artificial (IA), mientras que a los 30 días posteriores a la IA se determinó la tasa de preñez a traves de ultrasonografía trans-rectal. Esta última medición permitió determinar la variable de tasa de preñez a primer servicio (TPS). Se registró además el número de servicios por IA requeridos para lograr la concepción en cada vaca (SPC). Finalmente, la variable de días abiertos (DA) se calculó al substraer la cantidad de 282 d (duración de la gestación en bovinos) al intervalo entre dos partos consecutivos.

Indicador climático

Los datos de humedad relativa (HR) y de temperatura ambiental (TA) durante el período experimental se obtuvieron a través de consulta en la red climática de Agroson (www.agroson.org.mx). Dichos registros fueron empleados para calcular el índice de temperatura-humedad (ITH) usando la siguiente fórmula: ITH = 0.81 TA + HR (TA − 14.4) + 46.4 (Hahn, 1999).

De acuerdo a los valores de ITH (unidades) obtenidos durante el período experimental y usando la escala establecida por Zimbelman *et al*. (2009), el grado de estrés calórico existente se clasificó como: ausencia de estrés por calor (< 68), umbral (68 a 72), moderado (73 a 79) y severo (> 79).

Recolección de sangre, extracción de ADN y selección de SNPs

Muestras sanguíneas de cada vaca fueron recolectadas a través de punción de la vena coccígea. Posteriormente, se depositaron 5 - 6 gotas de sangre en tarjetas *FTA-Cards™* (Fast technology for analysis of nucleic acids; GeneSeek). Las tarjetas se enviaron al Laboratorio Neogen/Geneseek para la extracción y cuantificación de ADN de cada muestra sanguínea, y para el análisis de genotipificación.

Genes pertenecientes al eje de señalización GH/IGF1 se localizan en una región que incluye 23 Mb dentro del cromosoma bovino 5 (BTA5); dichos genes participan en diversos mecanismos fisiológicos relacionados con la fertilidad (Farber *et al*., 2006). Uno de estos genes, el gen PAPPA2, fue re-secuenciado facilitando la identificación de los SNP rs109952914 y rs384230354, siguiendo los procedimientos indicados por Rincón *et al*. (2009).

Análisis estadístico

Los valores promedio y frecuencias de los caracteres evaluados se calcularon usando los procedimientos MEANS y FREQ para variables continuas y categóricas, respectivamente. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron probados a través del procedimiento UNIVARIATE (Littell *et al*., 2002). Las frecuencias de alelos y genotipos para cada polimorfismo y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg fueron calculadas usando el procedimiento ALLELE (Saxton *et al*., 2004).

El estudio asociativo se llevó a cabo empleando un modelo estadístico de efectos mixtos por medio de los procedimientos MIXED y GLIMMIX para variables continuas (SPC y DA) y categóricas (TPS), respectivamente. Para el procesamiento estadístico de la información se empleó el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9.3, que incluyó los procedimientos para análisis de genes (Saxton *et al*., 2004). El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + e_{ijkl}$, Proc Mixed/Glimmix, donde:

y_{ijkl} = rasgo de fertilidad,
μ = valor promedio o frecuencia,
A_i = efecto fijo del genotipo del SNP,
B_j = efecto fijo de la edad,
C_k = covariable de los días en leche,
D_l = efecto aleatorio del semental, y
e_{ijkl} = error residual del experimento.

Si la expresión del genotipo fue detectada como una fuente de variación ($P < 0.05$) a partir del modelo estadístico asociativo, se procedió entonces a utilizar el procedimiento LSMEANS (opción PDIFF) para realizar las comparaciones entre los valores genotípicos promedio, considerando el ajuste Bonferroni (Weir, 2001). El efecto de substitución alélica se determinó usando un modelo de regresión que incluyó el efecto alélico como covariable (Falconer y Mackay, 1996). Los efectos genéticos dominantes y aditivos se obtuvieron utilizando la metodología establecidos por Luna-Nevarez *et al*. (2011). El efecto de dominancia o aditividad de los alelos del SNP del gen PAPPA2 fue confirmado a través de análisis de contrastes lineales y cuadráticos.

RESULTADOS

Los datos ambientales que se observan en la Figura 1 muestran que las vacas incluidas en este estudio estuvieron expuestas a condiciones climáticas que variaron de umbral de estrés por calor en marzo, a estrés por calor moderado a mediados de junio, confirmando la presencia de un clima cálido.

La Tabla 1 muestra los valores promedio para los principales caracteres reproductivos del periodo postparto en ganado bovino Holstein productor de leche. Dichos resultados son indicativos de una fertilidad postparto apropiada en los establos lecheros en los cuales se realizó el presente estudio. La variabilidad asociada a los caracteres reproductivos mostró una tendencia normal.

Las frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs rs109952914 y rs384230354 se observan en la Tabla 2. Ambos SNPs cumplen con los requisitos para marcadores genéticos al mostrar una frecuencia del alelo menor superior al 10 % (FAM > 0.10) y encontrarse en equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0.05$). Sin embargo, únicamente el SNP rs109952914 resultó ser predictor para las tres variables reproductivas (TPS, SPC y DA) en el análisis estadístico asociativo ($P < 0.05$). Por lo tanto, sólo los resultados de este polimorfismo fueron reportados en el presente estudio.

La Tabla 3 muestra los valores promedio (± error estandar) para las variables reproductivas analizadas con respecto a los tres genotipos del SNP rs109952914 del gen PAPPA2. El genotipo favorable fue el TT ($P < 0.05$) debido a que mostró

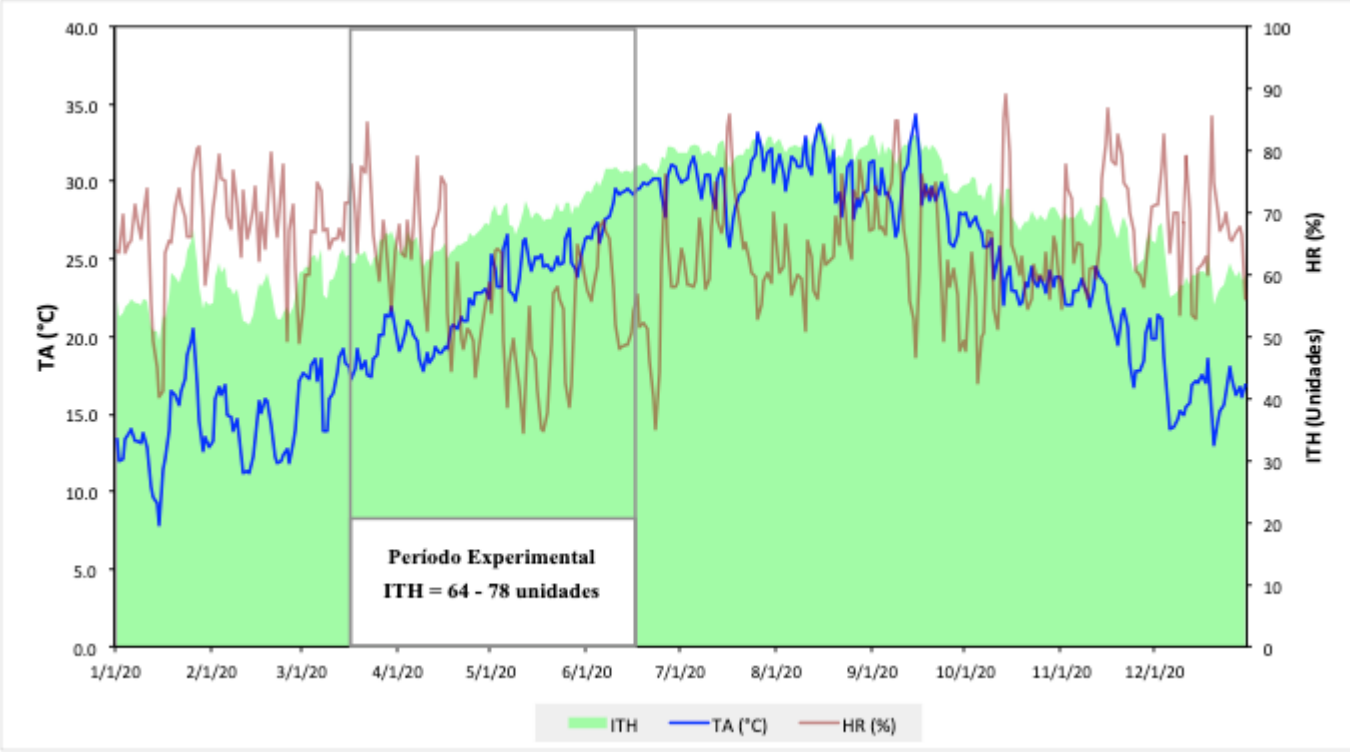


Figura 1. Valores promedio para temperatura ambiental (TA, ºC), humedad relativa (HR, %) e indicador temperatura-humedad (ITH, unidades) en el Valle del Yaqui durante el período experimental (Desde marzo 15 hasta junio 15).
Figure 1. Average values for ambient temperature (AT, ºC), relative humidity (RH, %) and temperature-humidity index (THI, units) in the Yaqui Valley during the experimental period (i.e., march 15 through june 15).

Tabla 1. Valores promedio ± EE para caracteres reproductivos postparto en vacas Holstein.
Table 1. Average values ± SE for postpartum reproductive traits in Holstein cow.

Caracter reproductivo	N	Media ± EE
Tasa de preñez a primer servicio	362	57.6 ± 2.87
Servicios por concepción	362	1.95 ± 0.04
Días abiertos	360	122.30 ± 8.60

valores de 66.70 ± 1.80 %, 1.76 ± 0.06 servicios y 91.22 ± 3.92 días, para las variables de TPS, SPC y DA, respectivamente. Por otra parte, el genotipo menos favorable resultó ser AA ya que mostró valores promedio de 38.80 ± 2.60 %, 2.30 ± 0.12 servicios y 159.80 ± 6.40 días, para los caracteres de TPS, SPC y DA, respectivamente.

La contribución del alelo favorable del SNP rs109952914, que resultó ser el alelo T, se observa en el efecto estimado de substitución alélica (SA) en la Tabla 4, al igual que los efectos fijos de aditividad y dominancia. El efecto de SA indica un incremento estimado de 12.60 % en TPS, así como una reducción de 0.16 en SPC y de 19.52 en DA, por cada alelo favorable T que esté presente en el genotipo del SNP. Los efectos fijos indican una tendencia lineal o aditiva, ya que la contribución positiva en la fertilidad mejoró en forma progresiva por la presencia de uno o mas alelos favorables.

El efecto del semental resultó ser significativo, lo cual indica que la variación causada por los sementales fue considerada adecuadamente dentro del modelo estadístico empleado.

DISCUSIÓN

El manejo reproductivo de la vaca Holstein durante el período postparto es de gran importancia para la rentabilidad de los establos lecheros, ya que después de un período de descanso voluntario de 2 a 3 meses es necesario que la vaca reinicie su actividad reproductiva, ello con el fin de alcanzar los 2 parámetros mas representativos que son la obtención de un parto/año y una lactancia de 305 días/año (Carvalho *et al*., 2014; Kok *et al*., 2019; Westwood *et al*., 2002; Dominguez-Castaño *et al*., 2020).

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas para SNPs del gen PAPPA2 evaluados por su asociación con las variables de tasa de preñez a primer servicio, servicios por concepción y días abiertos.
Table 2. Alelle and genotype frequencies for PAPPA2 SNPs evaluated due to its association with the traits first service pregnancy, services per conception and days open.

SNP	Gen	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas		
rs109952914	PAPPA2	A = 0.18	T = 0.82	AA = 0.03	AT = 0.30	TT = 0.67
rs384230354	PAPPA2	A = 0.74	G = 0.26	AA = 0.55	AG = 0.38	GG = 0.07

Tabla 3. Medias de cuadrados mínimos ± EE para caracteres reproductivos postparto entre genotipos del SNP rs109952914 dentro del gen PAPPA2 en vacas Holstein.
Table 3. Least square means ± SE for postpartum reproductive traits among genotypes from the SNP rs109952914 within the PAPPA2 gene in Holstein cows.

Caracter	N	Medias de cuadrados mínimos ± EE			*Prob*
		AA	AT	TT	
TPS	362	38.80 ± 2.60 [a]	54.10 ± 1.90 [b]	66.70 ± 1.80 [c]	0.0153
SPC	362	2.30 ± 0.12 [a]	2.02 ± 0.08 [b]	1.76 ± 0.06 [c]	0.0215
DA	360	159.80 ± 6.40 [a]	123.90 ± 5.91 [b]	91.22 ± 3.92 [c]	0.0027

Caracter = Variables reproductivas incluidas en el estudio (TPS = Tasa de preñez a primer servicio; SPC = Servicios por concepción; DA = Días abiertos); N = Número total de animales incluidos en el estudio; [a,b,c] indican diferencia estadística entre medias de cuadrados mínimos por genotipo de acuerdo al modelo estadístico; *Prob* = Valor de la probabilidad estadística para la comparación entre genotipos.

Tabla 4. Efectos de substitución alélica y efectos fijos de aditividad y dominancia para el alelo favorable del SNP rs109952914 del gen PAPPA2.
Table 4. Substitution allelic effects and fixed additive and dominance effects for the favorable allele from the SNP rs109952914 within the PAPPA2 gene.

Caracter	Alelo Fav	Efecto de substitución alélica			Efectos fijos		
		Prob [a]	Estimado [b]	EE [c]	*Prob* [d]	Aditivo [e]	Dominante [f]
TPS	T	0.0246	12.60	1.32	0.0239	13.95	1.35
SPC	T	0.0234	-0.16	0.05	0.0414	0.20	0.10
DA	T	0.0089	-19.52	5.64	0.0089	14.30	8.40

Caracter = Variables reproductivas analizadas (TPS = Tasa de preñez a primer servicio; SPC = Servicios por concepción; DA = Días abiertos); Alelo Fav = Alelo favorable para el SNP rs109952914.
[a] Significancia estadística para el efecto estimado.
[b] Valor estimado del efecto alélico expresado en unidades del caracter reproductivo.
[c] Error estandar para el efecto estimado.
[d] Significancia estadística para los efectos fijos.
[e] Efecto aditivo calculado como la diferencia entre los dos genotipos homocigotos dividida entre 2.
[f] Efecto dominante calculado como la diferencia entre el promedio de los genotipos homocigotos menos el valor del genotipo heterocigoto.

Uno de los factores que mas afecta a la vaca lechera es el clima, sobre todo cuando éste se caracteriza por un calor intenso gran parte del año capaz de inducir la presencia de estrés por calor (EC) en el ganado, lo cual dificulta la obtención de los 2 parámetros productivos antes mencionados (Gernand *et al*., 2019; Vinet *et al*., 2024). Sin embargo, se han detectado vacas Holstein que a pesar de estar expuestas a condiciones severas de EC, son capaces de mostrar un comportamiento reproductivo adecuado, lo cual sugiere que dichas vacas podrían ser portadoras de genes asociados a la habilidad de termo-tolerancia (Leyva-Corona *et a*l., 2018, Proaño-Morales *et al*., 2021).

Las condiciones ambientales en los establos lecheros ubicados en el sur de Sonora México se caracterizan por períodos prolongados de temperatura ambiental y humedad relativa altas a través del año, lo cual eleva el ITH por encima del umbral de 68 unidades a mediados de la primavera (Rivera-Acuña *et al*., 2015). A medida que las condiciones ambientales cálidas se vuelven más intensas al final de la primavera, el ITH se eleva en forma constante alcanzando su punto máximo en el verano, para después disminuir en el otoño. Este clima caluroso es único en el noroeste de México y crea condiciones adversas de estrés por calor para el ganado, lo cual brinda la oportunidad de estudiar las bases genéticas de la termotolerancia en ganado Holstein lactante (Hernández-Cordero *et al*., 2018; Zamorano-Algandar *et al*., 2023).

El presente estudio identificó un SNP (rs109952914) del gen PAPPA2 (Proteína Plasmática Asociada a la Preñez-A2), perteneciente al eje endócrino GH/IGF1, como predictor de las variables reproductivas de TPS, SPC y DA ($P < 0.05$). El genotipo favorable de dicho SNP fue el genotipo TT, el cual mostró una importante contribución de cada alelo T sobre los rasgos de fertilidad evaluados en vacas Holstein expuestas a condiciones de estrés por calor. Estos resultados sugieren la participación del gen PAPPA2 como un potencial predictor de la conducta reproductiva postparto en ganado Holstein (Leyva-Corona *et al*., 2018). Esto se atribuye al papel regulador que ejerce PAPPA2 sobre la bio-disponibilidad del IGF1, el cual es considerado como el principal marcador asociado a la mayoría de las funciones reproductivas en el organismo animal (Velazquez *et al*., 2008; Luna-Nevarez *et al*., 2012; Gobikrushanth *et al*., 2018).

El IGF1 que circula libre en la sangre es captado por las proteinas de enlace IGFBP3 a IGFBP5, las cuales inhiben el contacto del IGF1 con sus receptores en la superficie celular (Mense *et al*., 2018). El gen PAPPA2 codifica la síntesis de una metaloproteasa que incrementa la biodisponibilidad del IGF1, ya que se une a las proteínas IGFB3 e IGFBP5 facilitando su disociación, causando la liberación del IGF1 y modulando sus acciones sobre el aparato reproductor (Nishizawa *et al*., 2008; Barrios *et al*., 2021).

Los efectos de substitución alélica reportados en este estudio confirman la aportación favorable que tiene el SNP rs109952914 del gen PAPPA2 sobre los caracteres reproductivos analizados, ya que la presencia del alelo favorable de este SNP incrementa la TPS y reduce las variables de SPC y DA, en vacas Holstein manejadas bajo condiciones de clima cálido extremoso típicas del sur del estado de Sonora. Además, el efecto aditivo mostrado por el SNP rs109952914 confirmó el efecto positivo del alelo favorable T sobre la fertilidad del ganado.

Los resultados anteriores proporcionan evidencia para considerar al SNP rs109952914 del gen PAPPA2 como un SNP candidato para ser incluido en programas de selección asistida por marcadores (SAM), para mejorar la fertilidad en ganado bovino lechero bajo condiciones de estrés por calor. Esta estrategia para identificar SNPs o genes candidatos resulta de gran utilidad en programas de mejoramiento de la fertilidad cuando el ganado es expuesto a condiciones ambientales de calor extremo (Dikmen *et al*., 2015; Sigdel *et al*., 2020). Tales condiciones son típicas del sur de Sonora, donde los valores genéticos de predicción para sementales comerciales deberían considerar la interacción genotipo-ambiente para aumentar su precisión (Zamorano-Algandar *et al*., 2021). Lo anterior facilitaría la selección para mejorar fertilidad y tolerancia al calor en ganado Holstein manejado en climas extremosos (Shi *et al*., 2021).

La identificación y validación de genes candidatos ha sido reportada exitosamente en vacas Holstein para caracteres de producción de leche (Hernández-Cordero *et al*., 2017; Halli *et al*., 2021), resistencia a enfermedades (Shabalina *et al*., 2020) y termo-tolerancia (Halli *et al*., 2021; Zamorano-Algandar *et al*., 2023); en ganado de carne para caracteres de comportamiento (Sarti *et al*., 2019) y caracteres de la canal (Karisa *et al*., 2013); así como en ovinos para caracteres de termo-tolerancia (Luna-Nevarez *et al*., 2021) y fertilidad (Castillo-Salas *et al*., 2023).

La selección en base a genes o SNPs candidatos promete ser una potencial herramienta para la mejora genética de la fertilidad en vacas Holstein manejadas en el sur de Sonora (Contreras-Méndez *et al*., 2024). Las condiciones ambientales afectan la expresión genética, e influyen tanto en la fisiologia como en el comportamiento del ganado (Hansen, 2020); por la tanto, la identificación de SNPs o genes candidatos en ganado manejado bajo estrés por calor, permite categorizar las vacas de acuerdo a su capacidad de adaptación y habilidad reproductiva en ambientes cálidos adversos (Mota *et al*., 2020). Al respecto, la participación de genes como el PAPPA2 ha sido también reportada por su contribución favorable al mérito genético de caracteres de producción y fertilidad en vacas Holstein tales como vida productiva, facilidad al parto, tasa de gestación a primer servicio, servicios por concepción y dias abiertos (Wickramasinghe *et al*., 2011; Zamorano-Algandar *et al*., 2021).

Finalmente, es importante mencionar que la variación causada por el efecto del semental sobre las variables reproductivas analizadas en el presente estudio fue considerada dentro del modelo estadístico, al igual que en estudios previos de nuestro grupo (Leyva-Corona *et al*., 2018; Rodríguez-Borbón *et al*., 2023). Al respecto, sería interesante conocer si los sementales utilizados cuentan con el genotipo favorable para el SNP rs109952914 del gen PAPPA2; sin embargo, el ADN del semental no estaba disponible para su estudio genético ya que proviene de una compañía comercial distribuidora de semen. Actualmente, el genotipo del semental es reconocido como un factor importante que afecta la fertilidad del hato, por lo que novedosas tecnologías genómicas han sido propuestas para su estudio, con el fin de predecir su contribución en el desempeño de sus hijas (Pacheco *et al*., 2022).

CONCLUSIONES

Un polimorfismo del gen PAPPA2 (rs109952914) resultó ser un potencial predictor de la fertilidad postparto en ganado bovino Holstein expuesto a condiciones ambientales de clima cálido. El alelo favorable de dicho polimorfismo incrementó el porcentaje de gestación a primer servicio, y redujo los servicios por concepción y los días abiertos. Por lo anterior, se propone al SNP rs109952914 del gen de la Proteína Plásmática Asociada a la Preñez 2 (PAPPA2) como candidato para utilizarse en sistemas de selección asistida por marcadores genéticos, con el fin de mejorar la fertilidad postparto en vacas Holstein manejadas bajo el clima caluroso que prevalece la mayor parte del año en el sur de Sonora y que ocasiona estrés por calor en el ganado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los establos participantes del Valle del Yaqui por facilitar los animales e instalaciones requeridas para el presente estudio. Se agradece también a los estudiantes que apoyaron en la recolección de información y a los tesistas involucrados en el análisis de datos. Este proyecto fue patrocinado por el programa de apoyo a proyectos de investigación "UCMEXUS-CONACYT Grant Program (2010)".

CONFLICTOS DE INTERES

No existe ningún conflicto de interés en la realización del presente estudio de investigación.

REFERENCIAS

Angulo-Valenzuela, N.I., Thomas, M.G., Riley, D.G., Medrano, J.F., Reyna-Granados, J.R., Aguilar-Trejo, C.M. y Luna-Nevárez, P. 2021. A SNP within the PMCH gene as a molecular marker associated with fertility traits in Angus and Brangus beef heifers raised under a desert environment. Tropical Animal Health and Production. 53(3): 355.

Barrios, V., Chowen, J.A., Martín-Rivada, Á., Guerra-Cantera, S., Pozo, J., Yakar, S., Rosenfeld, R.G., Pérez-Jurado, L.A., Suárez, J. y Argente, J. 2021. Pregnancy-associated plasma protein (PAPP)-A2 in physiology and disease. Cells. 10(12): 3576.

Carvalho, P.D., Souza, A.H., Amundson, M.C., Hackbart, K.S., Fuenzalida, M.J., Herlihy, M.M., Ayres, H., Dresch, A.R., Vieira, L.M., Guenther, J.N., Grummer, R.R., Fricke, P.M., Shaver, R.D.

y Wiltbank, M.C. 2014. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 97(6): 3666-3683.

Castillo-Salas, C.A., Luna-Nevárez, G., Reyna-Granados, J.R., Luna-Ramirez, R.I., Limesand, S.W. y Luna-Nevárez, P. 2023. Molecular markers for thermo-tolerance are associated with reproductive and physiological traits in Pelibuey ewes raised in a semiarid environment. Journal of Thermal Biology. 112: 103475.

Contreras-Méndez, L.A., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Luna-Nevárez, G., López-Castro, P.A., Rivera-Acuña, F. y Luna-Nevárez, P. 2024. The anti-Müllerian hormone as endocrine and molecular marker associated with reproductive performance in Holstein dairy cows exposed to heat stress. Animals (Basel). 14(2): 213.

Daetwyler, H.D., Schenkel, F.S., Sargolzaei, M. y Robinson, J.A. 2008. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. Journal of Dairy Science. 91(8): 3225-3236.

Del Río-Avilés, A.D., Correa-Calderón, A., Avendaño-Reyes, L., Macías-Cruz, U., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Sánchez-Castro, M.A., Zamorano-Algandar, R., López-Castro, P.A. y Luna-Nevárez, P. 2022. Mineral supplementation (injectable) improved reproductive performance in Holstein cows managed in a warm summer environment. Reproduction in Domestic Animals. 57(8): 839-848.

Dikmen, S., Wang, X.Z., Ortega, M.S., Cole, J.B., Null, D.J. y Hansen, P.J. 2015. Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. Journal of Animal Breeding and Genetics. 132(6): 409-419.

Dominguez-Castaño, P., Vargas de Oliveira, M.H., El Faro, L. y de Vasconcelos Silva, J.A.I. 2020. Relationship between reproductive and productive traits in Holstein cattle using multivariate analysis. Reproduction in Domestic Animals. 55(7): 770-776.

Falconer, D.S. y McKay, T.C.F. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th Ed. Longman Scientific and Technical, New York, NY.

Farber, C. R., Corva, P.M. y Medrano, J.F. 2006. Genome-wide isolation of growth and obesity QTL using mouse speed congenic strains. BMC Genomics. 7: 1-17.

Gernand, E., König, S. y Kipp, C. 2019. Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. Journal of Dairy Science. 102(7): 6660-6671.

Gobikrushanth, M., Purfield, D.C., Colazo, M.G., Wang, Z., Butler, S.T. y Ambrose, D.J. 2018. The relationship between serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentration and reproductive performance, and genome-wide associations for serum IGF-1 in Holstein cows. Journal of Dairy Science. 101(10): 9154-9167.

Hahn, G.L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. Journal of Animal Science. 77: 10-20.

Halli, K., Vanvanhossou, S.F., Bohlouli, M., König, S. y Yin, T. 2021. Identification of candidate genes on the basis of SNP by time-lagged heat stress interactions for milk production traits in German Holstein cattle. PLoS One. 16(10): e0258216.

Hansen, P.J. 2020. Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. Theriogenology. 154: 190-202.

Hansen, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E. y Chase, C.C. Jr. 2001. Adverse Impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. Theriogenology. 55: 91-103.

Hernández-Cordero, A.I., Sánchez-Castro, M., Zamorano-Algandar, R., Luna-Nevárez, P., Rincón, G., Medrano, J.F., Speidel, S.E., Enns, R.M. y Thomas, M.G., 2017. Genotypes within the prolactin and growth hormone insulin-like growth factor-I pathways associated with milk production in heat stressed Holstein cattle. Genetics and Molecular Research. 16(4): gmr16039821.

Karisa, B.K., Thomson, J., Wang, Z., Bruce, H.L., Plastow, G.S. y Moore, S.S. 2013. Candidate genes and biological pathways associated with carcass quality traits in beef cattle. Canadian Journal of Animal Science. 93(3): 295-306.

Kok, A., Lehmann, J.O., Kemp, B., Hogeveen, H., van Middelaar, C.E., de Boer, I.J.M. y van Knegsel, A.T.M. 2019. Production, partial cash flows and greenhouse gas emissions of simulated dairy herds with extended lactations. Animal. 13(5): 1074-1083.

Leyva-Corona, J.C., Reyna-Granados, J.R., Zamorano-Algandar, R., Sanchez-Castro, M.A., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Medrano, J.F., Rincon, G. y Luna-Nevarez, P. 2018. Polymorphisms within the prolactin and growth hormone/insulin-like growth factor-1 functional pathways associated with fertility traits in Holstein cows raised in a hot-humid climate. Tropical Animal Health and Production. 50(8): 1913-1920.

Littell, R.C., Stroup, W.W. y Freund, R.J. 2002. SAS for linear models. 4th Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Luna-Nevarez, P., Rincon, G., Medrano, J.F., Riley, D.G., Chase, C.C., Coleman, S.W., VanLeeuwen, D.M., DeAtley, K.L., Islas-Trejo, A., Silver, G.A. y Thomas, M.G. 2011. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone–insulin-like growth factor axis in straightbred and crossbred Angus, Brahman, and Romosinuano heifers: population genetic analyses and association of genotypes with reproductive phenotypes. Journal of Animal Science. 89: 926-934.

Luna-Nevarez, P., Rincon, G., Medrano, J.F., Riley, D.G., Chace, C. Jr., Coleman, S.W., DeAtley, K.L, Islas-Trejo, A., Silver, G.A. y Thomas, M.G. 2012. Identificacion de un polimorfismo del gen PAPP-A2 asociado a la fertilidad en vaquillas Romosinuano criadas en subtropico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 3(2): 185-200.

Mense, K., Heidekorn-Dettmer, J., Wirthgen, E., Brockelmann, Y., Bortfeldt, R., Peter, S., Jung, M., Höflich, C., Hoeflich, A. y Schmicke, M. 2018. Increased concentrations of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2, IGFBP-3, and IGFBP-4 are associated with fetal mortality in pregnant cows. Frontiers in Endocrinology (Lausanne). 9: 310.

Mota, L.F.M., Lopes, F.B., Fernandes Júnior, G.A., Rosa, G.J.M., Magalhães, A.F.B., Carvalheiro, R. y Albuquerque, L.G. 2020. Genome-wide scan highlights the role of candidate genes on phenotypic plasticity for age at first calving in Nellore heifers. Science Reports. 10(1): 6481.

Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Suzuki, M., Kato, T., Kogo, H., Sekiya, T., Kurahashi, H. y Udagawa, Y. 2008. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A2 in the serum of pre-eclamptic patients. Molecular Human Reproduction. 14: 595-602.

Pacheco, H.A., Rossoni, A., Cecchinato, A. y Peñagaricano, F. 2022. Deciphering the genetic basis of male fertility in Italian Brown Swiss dairy cattle. Science Reports. 12(1): 10575.

Proaño-Morales, A.B., Luna-Nevárez, G., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Zamorano-Algandar, R., Sánchez-Castro, M.A., Leyva-Corona, J.C. y Luna-Nevárez, P. 2021. Marcadores genéticos asociados a un indicador de tolerancia al estrés por calor en vacas Holstein lactantes del sur de Sonora México. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 17(2): 55-62.

Rincon, G., Farber, E.A., Farber, C.R., Nkrumah, J.D. y Medrano, J.F. 2009. Polymorphisms in the STAT6 gene and their association with carcass traits in feedlot cattle. Animal Genetics. 40(6): 878-82.

Rivera-Acuña, F., Prado-Martinez, E., Luna-Nevarez, P., Mendez-Castillo, M.G., Avendano-Reyes, L., Hernández-Chávez, J.F., Espinoza-Villavicencio, J.L., Hernandez-Ceron, J. y Correa-Calderon, A. 2015. Induction of lactation in Holstein cows using progesterone injections or progesterone vaginal inserts. Iranian Journal of Applied Animal Science. 5(1): 13-20.

Rodríguez-Borbón, A., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Torres-Simental, J.F., Rivera-Acuña, F., Hernández-Chávez, J.F. y Luna-Nevárez, P. 2023. Polymorphisms within the IGF1 and IGF1R genes associated with superovulation-related traits in Holstein dairy cows managed in a semiarid environment. Journal of Animal Behaviour and Biometeorology. 11(4): 2023029.

SAGARPA, 2020. Situación actual de la producción de leche de vaca a nivel mundial, nacional, estatal, distrital y por municipio 2019.. Boletín de Leche de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

Sarti, F.M., Ceccobelli, S., Lasagna, E., Di Lorenzo, P., Sbarra, F., Pieramati, C., Giontella, A. y Panella, F., 2019. Influence of single nucleotide polymorphisms in some candidate genes related to the performance traits in Italian beef cattle breeds. Livestock Science. 230: 103834.

Saxton, A.M., Balzarini, M.G., Cappio-Borlino, A., Czika, W., Fry, J.D., Gibson, G., Guerra, J.L.L., Kang, M.S., Macciotta, N.P.P., Pulina, G., Rosa, G.J.M., Saxton, A.M., Stalder, K.J., Tempelman, R.J., Wolfinger, R., Xu, C., Xu, S. y Yu, X. 2004. Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Inc., North Carolina.

Shabalina, T., Yin, T. y König, S. 2020. Survival analyses in Holstein cows considering direct disease diagnoses and specific SNP marker effects. Journal of Dairy Science. 103(9): 8257-8273.

Shi, R., Brito, L.F., Liu, A., Luo, H., Chen, Z., Liu, L., Guo, G., Mulder, H., Ducro, B., van der Linden, A. y Wang, Y. 2021. Genotype-by-environment interaction in Holstein heifer fertility traits using single-step genomic reaction norm models. BMC Genomics. 22(1): 193.

Sigdel, A., Liu, L., Abdollahi-Arpanahi, R., Aguilar, I. y Peñagaricano, F. 2020. Genetic dissection of reproductive performance of dairy cows under heat stress. Animal Genetics. 51(4): 511-520.

Tresoldi, G., Schütz, K.E. y Tucker, C.B. 2018. Cooling cows with sprinklers: Timing strategy affects physiological responses to heat load. Journal of Dairy Science. 101(12): 11237-11246.

Vaishnav, S., Chauhan, A., Ajay, A., Saini, B.L., Kumar, S., Kumar, A., Bhushan, B. y Gaur, G.K. 2003. Allelic to genome wide perspectives of swine genetic variation to litter size and its component traits. Molecular Biology Reproduction. 50(4): 3705-3721.

Velazquez, M.A., Spicer, L.J. y Wathes, D.C. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. Domest Animal Endocrinology. 35(4): 325-342.

Vinet, A., Mattalia, S., Vallée, R., Bertrand, C., Barbat, A., Promp, J., Cuyabano, B.C.D. y Boichard, D. 2024. Effect of temperature-humidity index on the evolution of trade-offs between fertility and production in dairy cattle. Genetic Selection Evolution. 56(1): 23.

Wanapat, M., Dagaew, G., Sommai, S., Matra, M., Suriyapha, C., Prachumchai, R., Muslykhah, U. y Phupaboon, S. 2024. The application of omics technologies for understanding tropical plants-based bioactive compounds in ruminants: a review. Journal of Animal Science and Biotechnology. 15(1): 58.

Wang, X., Maltecca, C., Tal-Stein, R., Lipkin, E. y Khatib, H. 2008. Association of bovine fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: An example of the ability of the candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. Journal of Dairy Science. 91: 2475-2480.

Weir, B.S. 2001. Forensics. Page 725 in Handbook of Statistical Genetics. D. J. Balding, M. Bishop, and C. Cannings Eds. John Wiley and Sons, LTD, New York, NY.

West, J.W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 86: 2131-2144.

Westwood, C.T., Lean, I.J. y Garvin, J.K. 2002. Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. Journal of Dairy Science. 85(12): 3225-3237.

Wickramasinghe, S., Rincon, G. y Medrano, J.F. 2011. Variants in the pregnancy-associated plasma protein-A2 gene on Bos taurus autosome 16 are associated with daughter calving ease and productive life in Holstein cattle. Journal of Dairy Science. 94: 1552-1558.

Yodklaew, P., Koonawootrittriron, S., Elzo, M.A., Suwanasopee, T. y Laodim, T. 2017. Genome-wide association study for lactation characteristics, milk yield and age at first calving in a Thai multibreed dairy cattle population. Agriculture and Natural Resources. 51(3): 223-230.

Zamorano-Algandar, R., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Sánchez-Castro, M.A., Luna-Nevárez, G., Leyva-Corona, J.C. y Luna-Nevárez, P. 2023. Genetic markers associated with milk production and thermotolerance in Holstein dairy cows managed in a heat-stressed environment. Biology (Basel). 12(5): 679.

Zamorano-Algandar, R., Sánchez-Castro, M.A., Hernández-Cordero, A.I., Enns, R.M., Speidel, S.E., Thomas, M.G., Medrano, J.F., Rincón, G., Leyva-Corona, J.C., Luna-Nevárez, G., Reyna-Granados, J.R. y Luna-Nevárez, P. 2021. Molecular marker prediction for days open and pregnancy rate in Holstein cows managed in a warm climate. Livestock Science. 250: 104536.

Zhao, Y.X., Gao, G.X., Zhou, Y., Guo, C.X., Li, B., El-Ashram, S. y Li, Z.L. 2022. Genome-wide association studies uncover genes associated with litter traits in the pig. Animal. 16(12): 100672.

Zimbelman, R.B., Rhoads, R.P., Rhoads, M.L., Duff, G.C., Baumgard, H. y Collier, R.J. 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high-producing dairy cows. In: Proc 24th Southwest Nutrition and Management Conference, 158-169.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Bougainvillea spectabilis como mediadora para la biosíntesis de nanopartículas de plata: evaluación de su efecto antimicrobiano y citotóxico

Bougainvillea spectabilis as a mediator for the biosynthesis of silver nanoparticles: evaluation of its antimicrobial and cytotoxic effect

Angel Daniel Ramírez-Herrera[1], Gloria Barbosa-Sabanero[2], María-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy[2] y Martha-Isabel González-Domínguez[1]

[1] Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Ingeniería en Nanotecnología, Sahuayo, Michoacán, México.

[2] Departamento de Ciencias Médicas, División Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León, 20 de enero 929, C.P 37000, León, Guanajuato, México.

ABSTRACT

The present study describes the biosynthesis, characterization, evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of silver nanoparticles (Ag-NPs), synthesized from the aqueous extract of flowers and bracts of the plant *Bougainvillea spectabilis*. Different extract volumes and concentrations of silver nitrate were evaluated on the morphology, size, and antimicrobial activity of Ag-NPs. The formation of these nanoparticles (NPs) was monitored by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis). Morphology and elemental analysis, were performed by scanning electron microscopy coupled with X-ray energy dispersive spectrophotometry (SEM-EDS), the agglomerates of particles with dimensions ranging from 40 nm to 60 nm were observed. The presence of silver was validated with X-ray diffraction (XRD) analysis. The synthesized Ag-NPs showed antimicrobial activity against some microorganisms isolated from diabetic foot infections, as well as control strains exhibiting greater efficacy against Gram-negative bacteria, than their Gram-positive counterparts. Ag-NPs showed cytotoxic activity in eukaryotic cells depending on their concentration, and in some cases increased cell proliferation at low concentrations. These results invite a more in-depth evaluation of the cytotoxic effect of these nanoparticles synthesized by this methodology for future application in the healthcare field.

Keywords: Biosynthesis, nanoparticles, antimicrobial, cytotoxic.

RESUMEN

El presente estudio describe la biosíntesis, caracterización, evaluación de la actividad antimicrobiana y citotoxicidad de las nanopartículas de plata (NP's-Ag) sintetizadas a partir del extracto acuoso de las flores y brácteas de la planta *Bougainvillea spectabilis*. Se evaluaron diferentes volúmenes de extracto y concentraciones de nitrato de plata sobre la morfología, tamaño y actividad antimicrobiana de las NP's-Ag. La formación de dichas nanopartículas (NP's) fueron monitoreadas mediante espectrofotometría de utravioleta-visible (UV-Vis). La morfología y análisis elemental fue realizado mediante microscopia electrónica de barrido acoplado con espectrofotometría de dispersión de energía de rayos X (MEB-EDS) observando aglomerados de partículas con dimensiones que oscilan entre los 40 nm y 60 nm. Se validó la presencia de plata con el análisis de difracción de rayos X (DRX). Las NP's-Ag sintretizadas presentaron actividad antimicrobiana contra algunos microrganismos aislados de infecciones en pie diabético, así como cepas control encontrando mayor eficacia en contra de las bacterias Gram-negativas a diferencia de su contraparte las Gram-positivas. Las NP's-Ag presentaron actividad citotóxica en células eucariotas dependiente de su concentración, y en algunos casos aumentó la proliferación celular a bajas concentraciones. Estos resultados invitan a una evaluación más profunda del efecto citotóxico de estas nanopartículas sintetizadas por esta metodología para una futura aplicación en el campo de la salud.

Palabras clave: Biosíntesis, nanopartículas, antimicrobiana, citotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la nanotecnología se abre un mundo de posibilidades, ya que ofrece la oportunidad de crear materiales con mejores propiedades a costos más rentables mediante el uso de nuevas metodologías de síntesis o la reinvención de las ya conocidas, las cuales generalmente son mediante procesos químicos, físicos y biológicos, ofreciendo una amplia gama de nanomateriales específicos (Kanmani y Lim, 2013). Siendo las nanopartículas metálicas las más atractivas debido a sus potenciales aplicaciones, por sus novedosas propiedades catalíticas, ópticas, electrónicas y en el área médica, por ejemplo, en la liberación de agentes terapéuticos, detección de patógenos, reparación de tejidos e inmunoensayos, destrucción de tumores, entre otras, generando un área de investigación bastante amplia (Khan *et al.*, 2017; Huq *et al.*, 2022).

Por su parte, las NP's-Ag han sido un tema importante de investigación, ya que actualmente, la plata (Ag) iónica tiene una amplia aplicación en diversas industrias, principalmente en productos de uso médico, por lo que se ha intentado encontrar maneras más rentables de utilizar la plata a nivel nanométrico (Kanmani y Lim, 2013). Sin embargo, todavía existe la necesidad de una vía de síntesis de NP's-Ag con me-

*Autor para correspondencia: Martha Isabel González Domínguez
Correo-e: migonzalez@ucemich.edu.mx.
Recibido: 8 de febrero de 2024
Aceptado: 30 de abril de 2024
Publicado: 7 de junio de 2024

nores costos, así como ambientalmente amigable. Por lo que, los métodos de la llamada "síntesis verde" se crearon para cumplir con protocolos de síntesis que no ostenten riesgos para el ambiente y que las NP's se produzcan libres del uso de productos químicos tóxicos, como es el caso de agentes reductores u oxidantes muy agresivos (Pantidos y Horsfall, 2014; Huq *et al*., 2022). En los últimos años, muchos enfoques biológicos para la síntesis de las NP's han sido reportados, realizándose principalmente con bacterias, hongos y plantas, siendo estas últimas las que proporcionan una mayor ventaja para la síntesis de NP's, por proporcionar agentes estabilizantes y funcionalizantes naturales sin la necesidad de presentar riegos biológicos (Villanueva-Ibáñez *et al*., 2015). Esta ventaja ha sido evidente en el uso de extractos de diversas plantas, que contienen una variedad de metabolitos secundarios como terpenos, aceites esenciales, flavonoides y fenoles, los cuales tienen la capacidad de reducir iones metálicos, lo que conduce a la formación de nanopartículas con tamaños y morfologías estables (Goutam *et al*., 2018). Algunos investigadores han reportado el uso de metabolitos, extraídos desde *B. spectabilis*, como fuente en la síntesis de nanopartículas metálicas como dióxido de titanio (López-Mercado *et al*., 2023) y de plata (Pareek *et al*. 2012; Bharathi *et al*., 2016)

Partiendo de lo antes mencionado y tomando en cuenta que la plata *B. spectabilis* presenta propiedades antimicrobianas que se ven potencializadas al estar presentes en tamaño nanométrico, además, de ser biocompatible. Este trabajo muestra una alternativa para la síntesis de NP's-Ag utilizando una planta de fácil acceso, que podría incluso llegar a ser usada industrialmente, así como reportar los efectos antimicrobianos y citotóxicos que estas NP's presentan.

MATERIALES Y METODOS

Preparación el extracto

Las flores y brácteas de *B. spectabilis* utilizadas fueron recolectadas en la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, las cuales fueron lavadas con agua destilada para eliminar posibles impurezas. El extracto se obtuvo a partir de 3 g de planta, en 80 ml de agua destilada por el método de decocción a 90°C por 10 min, se separó de la parte sólida mediante filtración a vacío, utilizando un filtro convencional.

Análisis cualitativo fitoquímico de extractos

El extracto obtenido se sometió a pruebas para conocer los fitoconstituyentes de los metabolitos secundarios presentes en el mismo, tomando en cuenta diferentes metodologías conocidas como Shinoda, pruebas de espuma, prueba de $FeCl_3$ y otras (Vimalkumar *et al*., 2014; Mahesh *et al*., 2013; Tamilselvan *et al*., 2016), las cuales se realizaron por triplicado.

Biosíntesis de las NP's-Ag

Para la síntesis de las NP´s se exploraron diversas concentraciones de nitrato de plata ($AgNO_3$, Golden Bell con pureza de 99.0 %), así como variaciones en la cantidad de extracto, como detalla la Tabla 1. Los volúmenes finales de las síntesis fueron ajustados a 10 mL con agua destilada para obtener las diferentes concentraciones. La biosíntesis fue desarrollada bajo condiciones de iluminación normal, agitación magnética constante (600 rpm), temperatura ambiente y el pH de la solución de la síntesis permaneció en 7 (± 0.1).

Tabla 1. Concentraciones utilizadas para la síntesis de NP's-Ag.
Table 1. Concentrations used for the synthesis of AgNP's.

Identificación de NP's	Extracto (mL)	Concentración de $AgNO_3$ (M)	Agua destilada (mL)
NP´s 1	0.4	$1x10^{-3}$	Todas las síntesis fueron aforadas a 10
NP´s 2	0.4	$2x10^{-3}$	
NP´s 3	0.8	$2x10^{-3}$	
NP´s 4	0.8	$3x10^{-3}$	
NP´s 5	1.2	$3x10^{-3}$	
NP´s 6	1.2	$4x10^{-3}$	

Caracterización de las NP's-Ag

Las propiedades ópticas fueron analizadas con un espectrofotómetro de UV-Vis Lambda 25 marca Perkin Elmer en un rango de longitud de onda de 200-800 nm. El producto de la síntesis fue centrifugado a 6000 rpm y el precipitado obtenido se colocó a 70 °C hasta la completa eliminación del agua para después ser utilizado para realizar el estudio. La morfología y parte de la composición elemental fueron detectadas por MEB usando un microscopio JEOL 66-10LV equipado con espectroscopia de EDS utilizando una potencia de 20 kV y distancia de trabajo de 10 mm, las muestras fueron recubiertas con oro. La estructura cristalina se determinó usando difractómetro de rayos X de polvo, modelo D8 Avance A25 marca Bruker con radiación CuKα (0.15405 nm), el ángulo de inicio fue 10.0931°, el ángulo final de 90.9941°, el paso de 0.015334, con un voltaje de 30 kV y una intensidad de corriente de 20 mA.

Pruebas antimicrobianas

La actividad antimicrobiana de las NP's-Ag fue confirmada usando la prueba antimicrobiana Kirby-Bauer con modificaciones contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* aislados de úlceras de pie diabético al igual que las cepas ATCC *Klebsiella pneumoniae* 700603 y *Staphylococcus aureus* 25923. Los microorganismos fueron sembrados (10^6 UFC) sobre el agar Mueller-Hinton (Fluka Analytical) mediante estría cerrada. Para la actividad antibacteriana se utilizaron pequeños discos de papel filtro de 5 mm de diámetro a los que se le colocaron 30 µl de las NP's-Ag y finalmente los cultivos fueron incubados a 37 °C por 24 h. Posterior al tiempo de incubación se midió el halo de inhibición de las muestras sobre las cepas estudiadas con el apoyo de un vernier. Se utilizó como control negativo el extracto de *B. spectabilis* y como control positivo las concentraciones utilizadas de $AgNO_3$ en cada síntesis.

Pruebas citotóxicas

Se utilizaron células humanas embrionarias de riñón (HEK-293T), se cultivaron siguiendo los métodos estándares de crecimiento en medio DMEM (por sus siglas en inglés medio

Eagle modificado de Dulbecco) bajo en glucosa, con glutamina y piruvato de sodio (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se incubaron bajo atmósfera húmeda a 37 °C y corriente de aire (95 % aire y 5 % CO_2) por 72 h. Posteriormente, la monocapa celular se lavó con NaCl 0.9 %, fue tratada con 2 mL de tripsina-EDTA 1X (GIBCO), durante 10-15 min a 37 °C y se añadieron 2 mL de medio DMEM para inactivar la tripsina. La suspensión celular se centrifugó por 2 min a 1300 rpm a 4 °C. Las células obtenidas fueron utilizadas para estudios de viabilidad y proliferación celular.

Para la prueba de viabilidad celular se utilizaron placas de 6 pozos en los cuales, se sembraron $2x10^5$ células/mL cultivadas durante 72 h siguiendo el método antes mencionado. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó medio con el tratamiento de NP's-Ag evaluando las NP´s 1, NP´s 2 y NP´s 3. Asimismo, se consideraron diluciones a una proporción de 1:10 y 1:100 de cada una de estas nanopartículas sintetizadas, se colocaron como controles el extracto de la flor y el $AgNO_3$ ($2x10^{-3}$ M), colocando 300 µL de cada tratamiento y llevándolos a un volumen final de 10 mL con el medio DMEM, cabe señalar que el control negativo solo contenía medio DMEM, se incubaron durante 2 h bajo atmósfera húmeda a 37 °C y corriente de aire (95 % aire y 5 % CO_2). Pasado el tiempo se desechó el medio y las células se trataron con 1 mL de tripsina-EDTA 1X (GIBCO), durante 10-15 min a 37 °C, posteriormente se añadió 1 mL de medio DMEM para inactivar la tripsina. La suspensión celular se centrifugó por 2 min a 1300 rpm a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla celular obtenida, se le agregó 1 mL de medio DMEM para suspenderse. Para evaluar la viabilidad, se tomaron 97 µL de la suspensión celular y se añadió 3 µL de solución de azul de tripano, empleando una cámara de Neubauer para el conteo de las células después del tratamiento. La viabilidad celular de cada condición se determinó empleando un microscopio óptico Motic Digital Microscope, contándose solo las células vivas.

Para realizar la prueba de proliferación celular se utilizaron placas de 96 pozos, en las cuales, se sembraron $1x10^5$ células/mL por pozo, siguiendo el método antes mencionado. Después se retiró el medio y se adicionó medio con el tratamiento de NP's-Ag evaluando solo las NP´s 1, NP´s 2 y NP´s 3, se colocaron como controles el extracto de la flor y el $AgNO_3$ ($2x10^{-3}$ M), se incubaron durante 2 horas bajo atmósfera húmeda a 37 °C y corriente de aire (95 % aire y 5 % CO_2). Después de este tiempo, se retiró el medio con el tratamiento, se realizaron lavados con una solución buffer de fosfatos salino (PBS) y se añadió en todos los pocillos 150 µL de solución de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT). Esta solución se preparó colocando 0.043 g de menadiona (Sigma Aldrich) en 2 ml de una solución agua-etanol (1:1) y se agitó hasta su completa disolución, luego se adicionaron 18 ml de agua destilada y finalmente se adicionaron 0.005 g de XTT (Sigma Aldrich). Se incubó la placa con el XTT durante 90 min a 37 °C y al finalizar el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro Multiskan go marca Thermo Scientific, comparando células sin tratamiento.

Análisis estadísticos

Los resultados de las pruebas de viabilidad y proliferación celulares fueron sometidos a un análisis estadístico donde los resultados se mostraron como la media ± desviación estándar. Para cada evaluación, se realizaron al menos tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA para determinar las diferencias entre los grupos, mediante el programa Statview 4.57 (Abacus Concepts Inc.) con un intervalo de confianza en el análisis de 95%. Se tomó como significativa una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

El extracto acuoso de flores y brácteas de *B. spectabilis* presentó una coloración violeta clara. Por su parte, en las pruebas fitoquímicas se encontraron flavonoides, saponinas, taninos, fenoles y glucósidos esteroideos. Luego de adherir las soluciones de $AgNO_3$ al extracto, al cabo de 3 min se comenzó a apreciar un cambio en la coloración de la solución pasando de un violeta claro a un rojizo obscuro, llegando finalmente a un color marrón amarillento observándose la coloración máxima a los 10 min de reacción.

La formación de NP's-Ag se corroboró mediante los espectros de UV-Vis de cada una de las síntesis donde se pueden observar cómo es que cambia el espectro del extracto a las bandas características de las NP's-Ag, los cuales cambiaban de picos de absorción entre los 530 y 550 nm generados por los metabolitos presentes en el extracto, a picos máximos cercanos a los 425 nm (Figura 1).

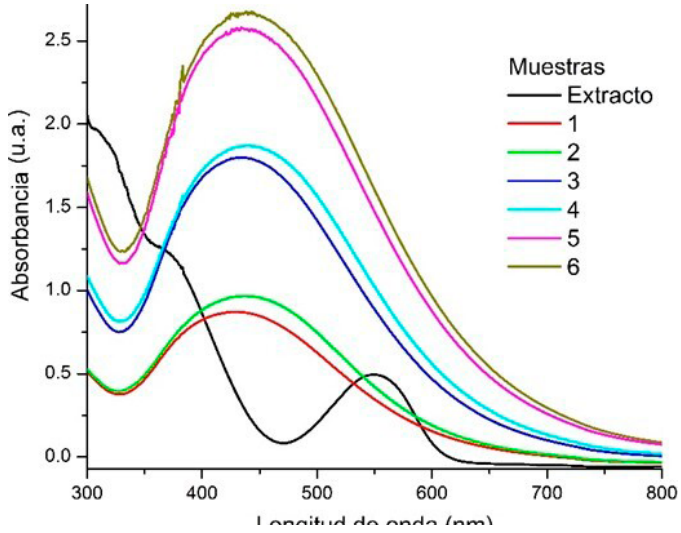


Figura. 1. Espectro de UV-Vis de las distintas NP´s sintetizadas después de 10 minutos de reacción y del extracto acuoso (1=NP´s 1, 2=NP´s 2, 3=NP´s 3, 4=NP´s 4, 5=NP´s 5 y 6=NP´s 6).
Figure. 1. UV-Vis spectrum of the different synthesized NP´S after 10 minutes of reaction and the aqueous extract (1=NP´s 1, 2=NP´s 2, 3=NP´s 3, 4=NP´s 4, 5=NP´s 5 y 6=NP´s 6).

A través de las micrografías capturadas con el MEB, se confirmó la presencia de las NP's sintetizadas. En la Figura 2, se presentan las micrografías representativas de la síntesis, donde se aprecian aglomerados de partículas con dimensiones nanométricas, oscilando entre los 30 nm y 60 nm. Estas partículas exhiben una morfología cuasi esférica en todos los cuadrantes analizados. Por otro lado, los análisis de los EDS realizados en todas las muestras de las NP's-Ag indican que la plata es el elemento principal constituyente de estos aglomerados, seguido por carbono (C) y oxígeno (O) como elementos secundarios. La presencia de C y O puede atribuirse a restos del medio de síntesis o a compuestos funcionalizantes adheridos en la superficie de las partículas.

Por medio de la técnica de DRX se obtuvo el patrón de difracción mostrado en la Figura 3, siendo el patrón de difracción principal la plata (JCPDS card No. 65-2871) con picos máximos en 38.107° (111), 44.29° (200), 64.43° (220), 77.38° (311) y 81.52° (222) y unos pequeños picos debido al cloruro de plata (JCPDS card No. 31-1238) en 27.803° (111), 32.213° (200), 46.20° (220) y 54.78° (311) los cuales, aparecen de acuerdo con los patrones de difracción indexados en el equipo. Se determinó el parámetro de red para la fase de Ag 4.086 Å y la fase de AgCl de 5.552 Å, ambos correspondientes al grupo espacial F M -3 M (No. 225). De acuerdo con la ecuación de Scherrer aplicada a los resultados obtenidos el tamaño de cristalito para la fase de Ag es de 30.77 nm y de 64.27 nm para la fase de AgCl.

Las NP's-Ag presentaron propiedades antibacterianas, observándose mayor inhibición de crecimiento bacteriano superior en comparación con el $AgNO_3$ que fue utilizado como control positivo. Además, se presentó una ausencia total de inhibición bacteriana al utilizar el extracto de *B. spectabilis* por lo que no se consideró colocar en las gráficas (Figura 4), destacando así la eficacia antimicrobiana específica de las NP's-Ag. La Figura 4 ilustra los halos de inhibición del crecimiento presentados por cada muestra de las nanopartículas de plata y el nitrato de plata en las cepas bacterianas evaluadas. Las barras azules representan las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (NP's1, NP's2, NP's3, NP's4, NP's5 y NP's6), mientras que las barras grises representan las concentraciones de nitrato de plata a las que fueron sinteti-

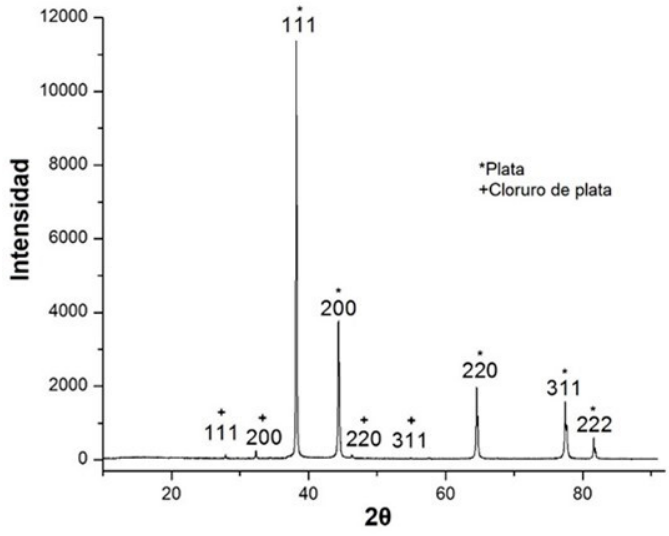


Figura 3. DRX de las NP's-Ag.
Figure 3. XRD of the AgNPs.

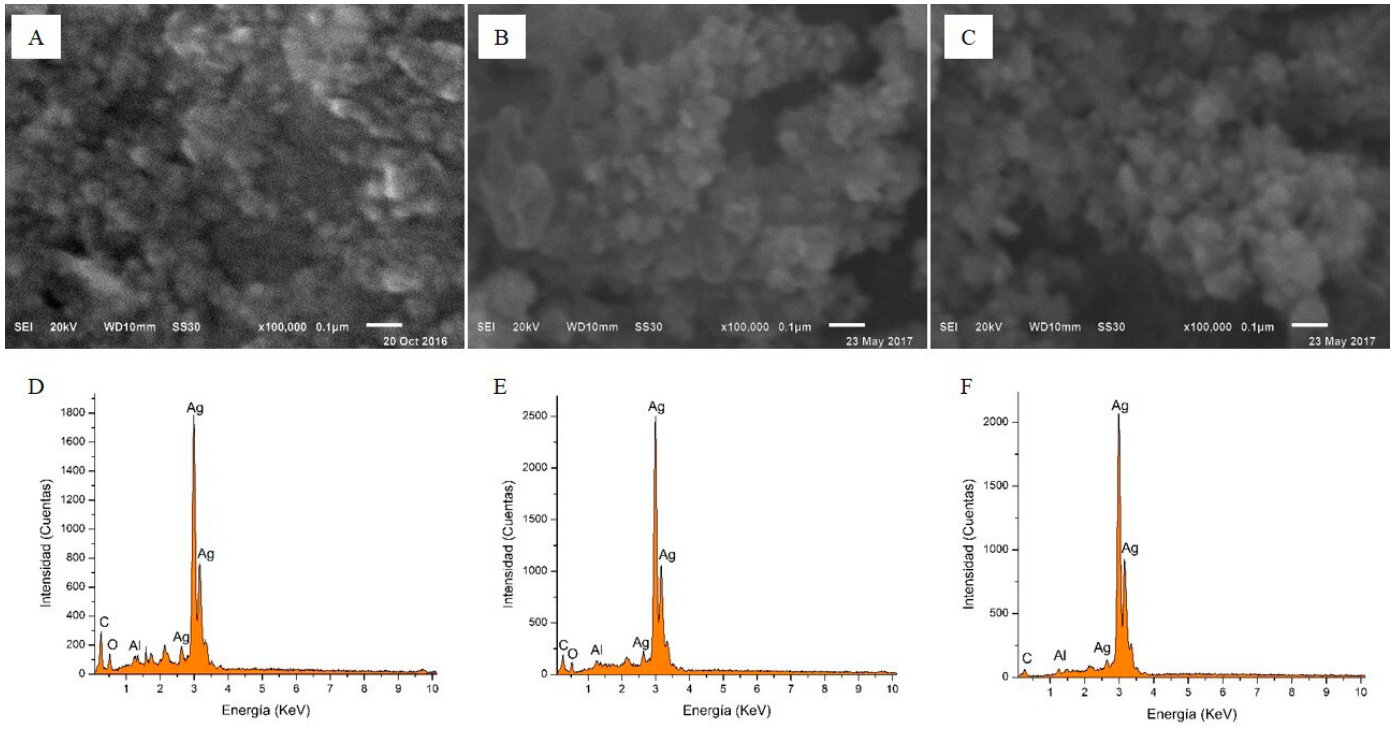


Figura. 2. Micrografías del MEB a 100000x y espectros de EDS de las síntesis [A), D)] NP´s 1, [B), E)] NP´s 2 y [C), F)] NP´s 3.
Figure. 2. SEM micrographs at 100000x and EDS spectra of samples [A), D)] NP´s 1, [B), E)] NP´s 2 and [C), F)] NP´s 3.

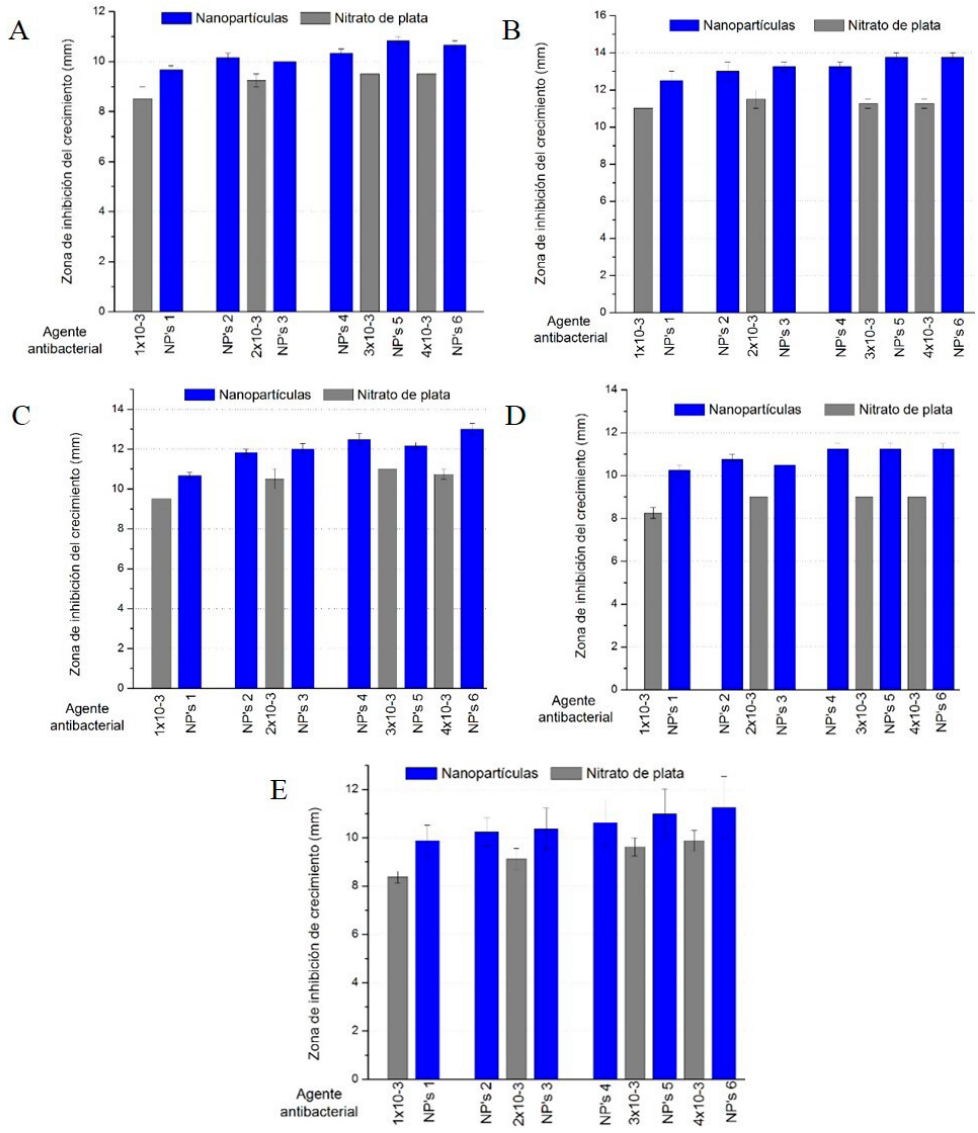


Figura. 4. Gráficas de los halos de inhibición del crecimiento para las muestras de nanopartículas de plata y nitrato de plata en A) *S. aureus* aislado clínico, B) *K. pneumoniae* ATCC, C) *P. aeruginosa* aislado clínico, D) *E. coli* aislado clínico y E) *S. aureus* ATCC. Nanopartículas=NP´s1, NP´s2, NP´s3, NP´s4, NP´s5 y NP´s6.
Figure. 4. Graphs of the growth inhibition zones for the silver nanoparticle and silver nitrate sample in A) *S. aureus* clinical isolate, B) *K. pneumoniae* ATCC, C) *P. aeruginosa* clinical isolate, D) *E. coli* clinical isolate and E) *S. aureus* ATCC. Nanoparticle=NP´s1, NP´s2, NP´s3, NP´s4, NP´s5 y NP´s6.

zadas las diferentes NP's-Ag, como se muestra en la Tabla 1. En ambos casos, tanto para las NP's-Ag como para el $AgNO_3$, se observa un incremento progresivo en el halo de inhibición del crecimiento bacteriano, desde las concentraciones más bajas hasta las más elevadas.

En el estudio de viabilidad celular se observaron alteraciones morfológicas como el crecimiento de vacuolas en las células tratadas con $AgNO_3$, NP2 y NP3, observándose en algunos casos un gran número de células muertas teñidas de color azul y la membrana irregular, lo cual no se presentó en el control, extracto, NP1 y en diluciones de las muestras las NP´s Ag (Figura 5). Cabe señalar que se presentaron diferencias significativas, encontrando los siguientes valores de citotoxicidad, en el extracto (0.907, ± 0.020), el $AgNO_3$ (0.678, ± 0.038), así como en las muestras NP1 (0.88, ± 0.059), NP2 (0.38, ± 0.046), NP21:100 (0.94, ± 0.028), NP3 (0.028, ± 0.004) y NP31:10 (0.78, ± 0.011). En el caso de la muestra NP11:10 (1.09, ± 0.072) se encontró una tendencia a aumentar el efecto proliferativo. Por su parte, no se apreció un cambio significativo en los tratamientos NP11:100 (0.96, ± 0.035), NP21:10 (0.97, ± 0.031) y NP31:100 (0.967, ± 0.009), como se puede apreciar en la Figura 6 A.

En las pruebas de proliferación, se obtuvo que las NP1 (1.15, ± 0.11) aumentaron significativamente la actividad mitocondrial (proliferación celular), mientras que su contraparte los iones de plata la disminuyeron ligeramente, siendo las muestras NP2 (0.72, ± 0.078) y NP3 (0.409, ± 0.071) las que disminuyeron la actividad mitocondrial en mayor medida y con significancia estadística al compararse al control. Cabe señalar que la muestra NP3 tuvo una diferencia significativa

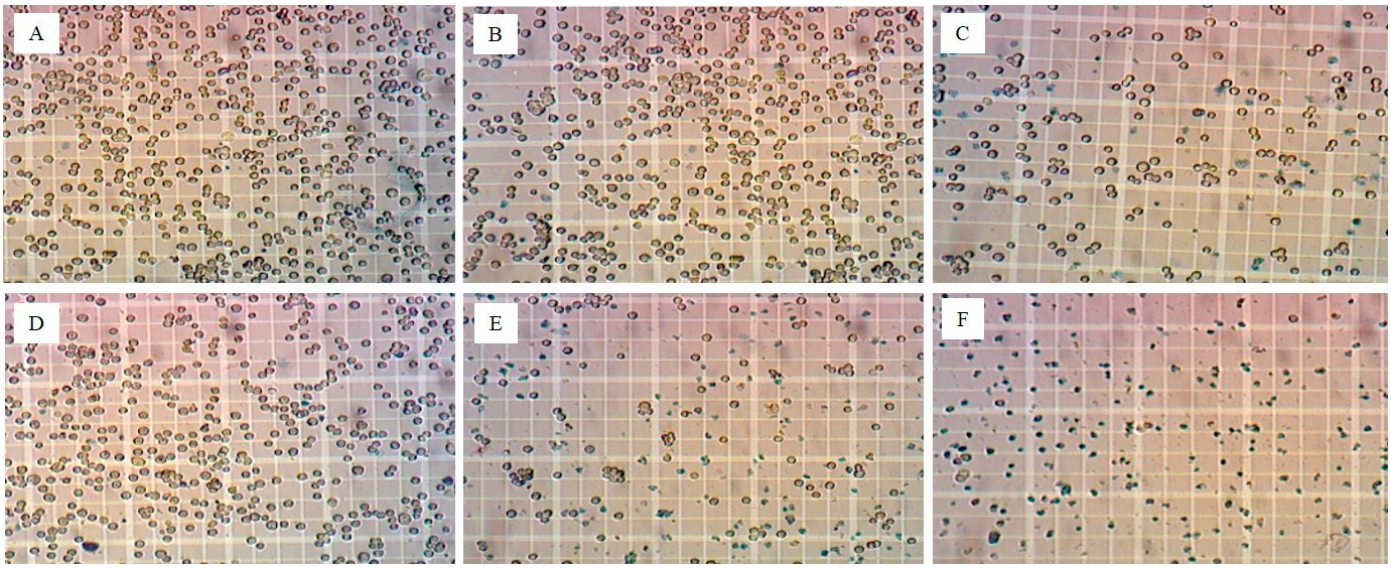


Figura. 5. Fotografías de las diferentes muestras en el estudio de Viabilidad. A) Control, B) Extracto, C) $AgNO_3$, muestras de D) NP´s1, E) NP´s2 y F) NP´s3.
Figure. 5. Photographs of the different samples in the Viability study. A) Control, B) Extract, C) $AgNO_3$, samples of D) NP´s1, E) NP´s2 and F) NP´s3.

con respeto al extracto en la disminución de la actividad mitocondrial (Figura 6 B).

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo reportado por Hernandez-Martinez *et al*. (2011), la coloración violeta del extracto es causada por una familia de biomoléculas llamadas betacianinas extraídas que pudiesen ser: betanina, betanidina, indicaxantina y/o ácido betalámico; además de flavonoides como: apigenina 7-o-β-glucopiranósido, rutina, quercetina; así como también fenoles: ácido clorogénico, ácido gálico (Nidhi *et al*., 2016). Que, debido a su arreglo estructural y grupos funcionales, estás moléculas podrían ser partícipes en la quelación, reducción o estabilización de las NP's-Ag de manera activa o pasiva, debido a que son conocidas por presentar propiedades antioxidantes (Kumar *et al*., 2017). Estos componentes tienen la capacidad de actuar como agentes reductores, debido a que pueden generarse transformaciones tautoméricas en estas moléculas, de la forma enol a la forma ceto, desligando un átomo de hidrógeno reactivo para reducir los iones metálicos a NP's. Además, estas moléculas son capaces de quelar los iones metálicos con sus grupos funcionales. Lo anterior implica que no solo están presentes en las fases iniciales de la nucleación de NP's-Ag, sino también en la agregación de éstas a parte de su presencia en la bioreducción. Por ello, fue posible la biorreducción, agregación y estabilización de las NP's-Ag como fue reportado por Pareek *et al*. (2012), quienes utilizaron únicamente las brácteas de una planta de la misma especie, pero de una variedad diferente.

Es importante destacar que, de acuerdo con la coloración obtenida del extracto, además de tomar en cuenta lo reportado por Hernandez-Martinez *et al*. en el 2011, donde

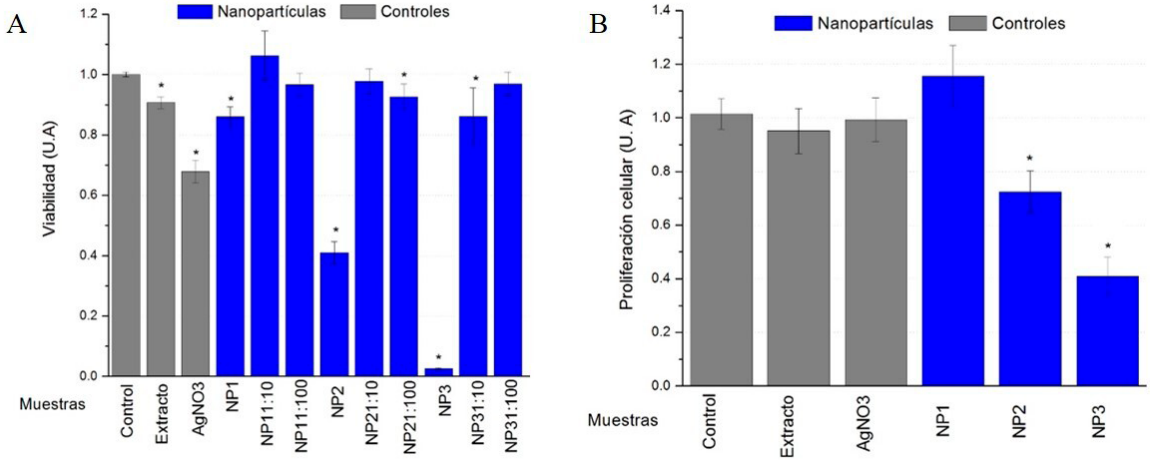


Figura. 6. Gráficas de los resultados obtenidos en los estudios de A) viabilidad celular y B) proliferación celular. * Muestras con diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0.05$). # Muestra con diferencia significativa respecto al extracto ($p \leq 0.05$).
Figure. 6. Graphs of the results obtained in the studies of A) cell viability and B) cell proliferation. * Samples with a significant difference compared to the control ($p \leq 0.05$). # Samples with significant difference compared to the extract ($p \leq 0.05$).

ellos usando extractos acuosos de *B. spectabilis* les fue posible extraer betacianinas, lo que sugiere que es muy probable que en el proceso de extracción se obtuvieran estos componentes, los cuales son solubles en agua además de que presentan una coloración entre rojo-violeta, dependiendo del pH al que se encuentren. Asimismo, los autores mencionan que las betacianinas extraídas presentan picos máximos de absorbancia máxima en su espectro de UV-Vis aproximadamente en 535 nm, algo que en el espectro del extracto inicial se observa con un pico de absorción entre los 530 y 550 nm (Figura 1), y al pasar el tiempo esta banda desaparece completamente dando origen a las bandas de NP's-Ag, lo que sugiere significativamente que estas biomoléculas tienen también un papel importante en el proceso de síntesis de dichas NP´s.

Es relevante resaltar una característica distintiva de estas NP's, la cual se centra en su interacción con la radiación electromagnética. La tonalidad exhibida por las dispersiones de nanopartículas está directamente relacionada a su tamaño y forma, debido a la longitud de onda de la luz que dispersan y transmiten, por lo que la intensidad del color y absorbancia depende de la concentración a la que se encuentren. Lo anterior ocurre debido a las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción, que, al ser excitados por la radiación electromagnética, generan un efecto denominado plasmón de resonancia superficial. Como ha sido ampliamente reportado por diversos autores como es el caso de Villanueva-Ibáñez *et al*. (2015), donde hacen mención que las NP's-Ag exhiben un color marrón amarillento en solución acuosa debido a las vibraciones del plasmón de resonancia superficial en las NP's-Ag. Lo anterior indica que el extracto es capaz de reducir los iones de plata de Ag^{1+} a Ag^{0} y hacer que estos átomos se agreguen formando las NP's. Así, se comprueba que efectivamente los metabolitos están realizando la reducción, agregación y estabilización como se planteó anteriormente.

Como se puede observar en las imágenes MEB-EDS al igual que el patrón de difracción es algo que ha sido ampliamente reportado sin importar si se sintetizan las NP's por métodos verdes o químicos, como lo ha sido reportado por Agasti y Kaushik (2014) al igual que Shaik *et al*. (2016).

El hecho de que las NP's-Ag presenten mayor inhibición de crecimiento bacteriano se debe a que interactúan de manera diferente que los iones de Ag, algunos de los mecanismos hipotéticos planteados que pudieran estar ocurriendo son, a) la adhesión de las NP's-Ag a la superficie de la pared celular y la membrana alterando la permeabilidad de estas, provocando cambios irreversibles en la estructura de la pared celular, dando lugar a su interrupción ocasionando posteriormente la liberación de diferentes biomoléculas, b) la penetración de NP's-Ag dentro de la célula ocasionando daño de las estructuras intracelulares y biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN), c) la inducción de toxicidad celular mediante el estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres seguido por el agotamiento de la producción de ATP intracelular, produciendo la interrupción de la replicación del ADN y el daño del ADN y por último d) las uniones de NP's-Ag y sus iones con diferentes enzimas inactivándolas, resultando en una falla en el metabolismo celular, como la respiración celular (Dakal *et al*., 2016).

Además, el efecto antibacteriano que se presentó con mayor eficacia en contra de las bacterias Gram-negativas a diferencia de su contraparte las Gram-positivas, es la derivación de diversos factores que influyen en el potencial antimicrobiano de las NP's-Ag, como el espesor y la composición de la pared celular de los microorganismos. Lo anterior, a causa de que las bacterias Gram-negativas, como la *E. coli*, tienden a ser más susceptibles a estas NP's, que las bacterias Gram-positivas, como *S. aureus*, por la diferencia en la organización del peptidoglicano, el cual es el componente clave de la pared celular bacteriana y está cargado negativamente. Las bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una pared celular con un espesor aproximado de 30 nm, difieren significativamente de las bacterias Gram-negativas, cuya pared celular tiene un grosor de aproximadamente 3-4 nm. Esta diferencia estructural conlleva a que la pared celular más gruesa de las bacterias Gram-positivas propicie una mayor adherencia de iones de plata y NP's-Ag a su superficie (Villanueva-Ibáñez *et al*., 2015). Además, otro factor importante son los lipopolisacáridos presentes en la membrana celular, los cuales están en mayor cantidad en bacterias Gram-negativas y tienen de igual manera carga negativa promoviendo la adhesión de NP's-Ag (Dakal *et al*., 2016). Por estas razones, las bacterias Gram-positivas, son comparativamente más resistente a la terapia con NP's-Ag, caso contrario, las bacterias Gram-negativas son más susceptibles a la terapia antimicrobiana basada en NP's-Ag debido a su pared celular menos densa y a su mayor cantidad de lipopolisacáridos, lo que es congruente con los resultados obtenidos en el presente estudio.

La internalización de las NP's-Ag a las células eucariotas, son procesos que se desconocen en gran medida ya que cambian dependiendo de cada célula, se han planteado mecanismos hipotéticos para la captación de NP's-Ag por las células que muy probablemente estarían ocurriendo en este estudio, los cuales incluyen la pinocitosis, la endocitosis dependiente de caveolina y clatrina y la fagocitosis (Zhang *et al*., 2016; Milić *et al*., 2014). Adicionalmente, las propiedades físicas de las NP's-Ag juegan un papel importante, como por ejemplo su forma, el tamaño de partícula, en donde las NP's más grandes son envueltas más rápido y producen suficiente energía para entrar a la célula, y las NP's más pequeñas deben ser agrupadas porque su acoplamiento individual no produce suficiente energía para envolverlas completamente y ser ingresadas, así como también otras de las propiedades a considerar es la aglomeración de dichas NP´s ya que se ha mostrado un aumento en la captación de estas cuando se encuentran agregadas y finalmente otra de las propiedades es la carga superficial la cual controla la unión a diferentes moléculas y a las células, para posteriormente dirigir a las NP's a los compartimentos celulares, todas estas propiedades desempeñan un papel crucial en su captación por las células

(Zhang *et al*., 2016; Milić *et al*., 2014; McShan *et al*., 2014; Shannahan *et al*., 2015; Jiao *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2015). También es importante mencionar que una vez que las NP's-Ag entran en las células, el destino de estas en las células se determina por varios factores, incluyendo la eficacia de la defensa antioxidante, la eficiencia de los sistemas de reparación del ADN, la propensión apoptótica y los mecanismos de señalización celular, por lo que, tomando en cuenta lo anterior su captación tiene dos etapas principales: La etapa de unión en la membrana celular y la etapa de internalización (Dakal *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2016).

En general, las células son capaces de bioacumular Ag en su sistema. Las NP's-Ag pueden ser oxidadas parcialmente en suspensión, lo que las conduce a la liberación lenta de Ag iónica, la cual es conocida como una de las formas más tóxicas de este metal pesado; por lo que, cualquier NP's-Ag representa una fuente potencial de toxicidad causada por la liberación de Ag en solución acuosa, pero esta modificación *in vitro* o no de las NP's-Ag depende de factores como el pH, la fuerza iónica, la viabilidad termodinámica, la concentración de la especie, la facilidad cinética de las transferencias de electrones, las condiciones redox de los medios biológicos y las condiciones intracelulares (Zhang *et al*., 2016; Milić *et al*., 2014; Monteiro-Riviere *et al*., 2013; Shannahan *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2015; Kaba y Egorova, 2015), lo que nos lleva a considerar como perspectivas de este estudio realizar la evaluación de estos diferente factores para así poder explicar con mayor precisión por qué se observa menor viabilidad celular a concentraciones mayores de NP's-Ag en comparación al $AgNO_3$ utilizado.

Por otro lado, es lógico que la liberación de iones no explique toda la toxicidad. Existen otros factores secundarios que acompañan a la toxicidad de éste tipo de NP's como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), pues células expuestas a la NP's-Ag, muestran aumentos en la citotoxicidad, la genotoxicidad, la respuesta inflamatoria y la activación de diversas rutas de señalización, asociado en gran medida a la generación de ROS y consecuentemente a la acumulación de estrés oxidativo. Los niveles intermedios de estrés oxidativo dentro de la célula pueden resultar en: la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial; la activación de cascadas de señalización celular, como la vía se señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica (MAPK); factores de transcripción , como AP-1, Nrf-2 y factor nuclear kappa-B (NF-kB) y citoquinas, como la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), p38MAPK y JNK, dando como resultado un daño permanente a las células, en forma de la detención del ciclo celular en las fases G1 y S, esto debido a la interacción NP's-proteínas ocasionando proteínas mal plegadas, conduciendo a daños en el ADN, las aberraciones cromosómicas, la apoptosis en la célula a través de la liberación de citocromo C en el citosol y la disfunción mitocondrial, causando afecciones a la cadena de la respiración mitocondrial (Dakal *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2016; Milić *et al*., 2014; McShan *et al*., 2014; Monteiro-Riviere *et al*., 2013; Shannahan *et al*., 2015; Jiao *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2015; Kaba y Egorova, 2015). Éste último es de gran importancia, ya que, sería una de las razones por la cual en el estudio de proliferación celular de las muestras NP´s2 y NP´s3, las cuales son las NP's-Ag sintetizadas con mayor concentración de nitrato de plata se observa una disminución en la función mitocondrial, como podemos observar hay una gran cantidad de evaluaciones celulares y moleculares que se deben realizar para poder entender mejor la citotoxicidad de dichas nanopartículas.

Otros estudios han observado efectos completamente diferentes dependientes de las concentraciones. Si bien, la mayoría de resultados reportados muestran que las NP's-Ag a dosis altas son considerablemente más tóxicas que los iones de éste metal, también han encontrado hallazgos intrigantes que sugieren que a dosis bajas las NP's-Ag aceleran la proliferación celular, a diferencia de la plata iónica que a niveles similares no aumenta la viabilidad celular (McShan *et al*., 2014; Monteiro-Riviere *et al*., 2013; Shannahan *et al*., 2015; Jiao *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2015; Kaba y Egorova, 2015; Samberg *et al*., 2010). Lo antes citado, corrobora los efectos proliferativos presentados con las dosis más bajas estudiadas en el ensayo de viabilidad celular de este trabajo. La actividad biológica de las NP's-Ag depende de las biomoléculas presentes, entre ellas los aminoácidos, proteínas u otros compuestos orgánicos o inorgánicos. La Ag forma enlaces químicos fuertes con muchos compuestos presentes en entornos biológicos, los compuestos generados experimentan intercambios tautoméricos para preservar la estabilidad, siendo las uniones con azufre las que predominan, dado que termodinámicamente resulta más estable para las NPs-Ag. Estos enlazamientos con el azufre se corroboran mediante la presencia de una "corona" proteica formada en la superficie de las NP's, que contribuye a la internalización de las NP's a la célula y facilita las interacciones dentro de la célula para inducir o mitigar completamente la toxicidad (Dakal *et al*., 2016; Duran *et al*., 2015; Samberg *et al*., 2010). Lo antes mencionado, es una posible razón del porque a menores concentraciones se observa poca o nula toxicidad, pues se podrían estar generando estas coronas proteicas estabilizando las NP´s y mitigando los efectos de estrés oxidativo en las células tratadas.

Es importante señalar que Monteiro-Riviere *et al*. en el 2013, realizaron un trabajo con cantidades muy pequeñas de NP's-Ag muy parecidas a las concentraciones utilizadas en este estudio, además usaron las células HEK-293T, y mencionan que las NP's-Ag no eran tóxicas para las células, si no los contaminantes residuales que estas contenían lo que provocaba la citotoxicidad, estos contaminantes podrían estar presentes desde la síntesis de estas NP's-Ag o incluso de restos de biomoléculas adheridas debido a la degradación de las NP's-Ag dentro de la célula creando ROS que dañarían la maquinaria celular y el ADN, por lo que posiblemente el daño provocado por estas NP's-Ag esta mediado por la concentración de compuestos del extracto que quedaron recubriendo a las NP's.

CONCLUSIONES

La biosíntesis de NP's-Ag utilizando el extracto acuoso de *B. spectabilis* es un método simple, amigable con el medio ambiente y rápido para la obtención de estas NP's. Las NP's-Ag presentaron mayor inhibición del crecimiento bacteriano que el $AgNO_3$, destacando su eficacia especialmente contra bacterias Gram negativas. Además, los resultados de los ensayos citotóxicos revelaron que las NP's-Ag generadas presentan propiedades proliferativas a una concentración específica y citotóxicas cuando se tiene una concentración mayor de estas en las células HEK-293T, observando resultados prometedores a concentraciones más bajas, donde no se evidenciaron daños celulares y se logró apreciar un aumento en la proliferación celular. Para obtener una comprensión más sólida y perspectivas claras sobre el potencial uso beneficioso de las nanopartículas de plata (NP's-Ag) en concentraciones óptimas, es fundamental profundizar en el análisis de los mecanismos moleculares y celulares asociados con los cambios observados *in vitro* en este estudio. Este enfoque permitirá una evaluación más precisa del equilibrio deseado entre la actividad citotóxica y proliferativa en las células examinadas, fortaleciendo así la base para considerar con mayor convicción la viabilidad y los beneficios potenciales de las NP's-Ag considerando que tienen potenciales aplicaciones en el campo biomédico, por lo que podrían ser utilizadas en el tratamiento de infecciones, ya que pueden ser aplicadas en un sinfín de productos comerciales utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos microbianos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Antonio Álvarez Canales de la UG, por la donación de las cepas bacterianas.

A la Dra. Yolanda Alvarado Caudillo de la UG, por la asesoría técnica en los ensayos de citotoxicidad y al Ing. Francisco J. Reynoso Marín de la UCEMICH por su apoyo en las técnicas de caracterización.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores de este trabajo declaran que no existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

Agasti, N. y Kaushik, N.K. 2014. One pot synthesis of crystalline silver nanoparticles. American Journal of Nanomaterials. 2(1): 4-7.

Bharathi, D., Kalaichelvan, P. T., Atmaram, V. y Anbu, S. 2016. Biogenic synthesis of silver nanoparticles from aqueous flower extract of *Bougainvillea spectabilis* and their antibacterial activity. J. Med. Plants, 4(5), 248-252.

Dakal, T.C., Kumar, A., Majumdar, R.S. y Yadav, V. 2016. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Frontiers in Microbiology. 7: 1-17.

Durán N., S. Camila P., Durán M. y Martinez D. S. T. 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. Journal of Nanobiotechnology. 13: 1-17.

Goutam, S. P., Saxena, G., Singh, V., Yadav, A. K., Bharagava, R. N. y Thapa, K. B. 2018. Green synthesis of TiO_2 nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. Chemical Engineering Journal, 336, 386-396.

Hernandez-Martinez, A.R., Estevez, M., Vargas, S., Quintanilla, F. y Rodríguez, R. 2011. New dye-sensitized solar cells obtained from extracted bracts of *Bougainvillea glabra* and *spectabilis* betalain pigments by different purification processes. International Journal of Molecular Sciences. 12(9): 5565-5576.

Huq, M. A., Ashrafudoulla, M., Rahman, M. M., Balusamy, S. R. y Akter, S. 2022. Green synthesis and potential antibacterial applications of bioactive silver nanoparticles: a review. Polymers, 14(4), 742.

Jiao, Z.H., Li, M., Feng, Y.X., Shi, Ji.C., Zhang, J. y Shao, B. 2014. Hormesis effects of silver nanoparticles at non-cytotoxic doses to human hepatoma cells. Plos One. 9(7): 1-12.

Kaba, S.I. y Egorova, E.M. 2015. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. Nanotechnology, Science and Applications. 8: 19-29.

Kanmani, P. y Lim, S.T. 2013. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterialexopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrugresistant pathogens. Process Biochemistry. 48(7): 1099-1106.

Khan, I., Saeed, K. y Khan, I. 2017. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, 12: 908-931.

Khan, M., Khan, M., Adil, S.F., Tahir, M.N., Tremel, W., Alkhathlan, H.Z., Al-Warthan, A. y Siddiqui, M.R.H. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Pulicaria glutinosa* extract. International Journal of Nanomedicine. 8: 1507-1516.

Kumar, S.N.A., Ritesh, S.K., Sharmila, G. y Muthukumaran, C. 2017. Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts. Arabian Journal of Chemistry. 10(2): S2145-S2150.

López-Mercado, J., González-Domínguez, M. I., Reynoso-Marin, F. J., Acosta, B., Smolentseva, E. y Nambo, A. 2023. Green synthesis of TiO_2 for furfural production by photohydrolysis of tortilla manufacturing waste. Scientific Reports, 13(1), 15355.

Mahesh A.R., Ranganath M.K. y Harish Kumar D.R. 2013. Enrichment of flavonoids from the methanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots by partitioning technique. Research Journal of Chemical Sciences. Vol. 3, pp: 43-47.

McShan, D., Ray, C.P. y Yu, H. 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. Journal of Food Drug Analysis. 22(1): 116-127.

Milić, M., Leitingerb, G., Pavičića, I., Avdičevićd, M.Z., Dobrovićd, S., Goesslere, W. y Vrčeka, I.V. 2014. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. Journal of Applied Toxicology. 35(6): 581-592.

Monteiro-Riviere, N.A., Samberg, M.E., Oldenburg, S.J. y Riviere, J.E 2013. Protein binding modulates the cellular uptake of silver nanoparticles into human cells: Implications for in vitro to in vivo extrapolations? Toxicology Letters. 220(3): 286-293.

Nidhi, M., Vijay-Lakshmi, T., Kuldeep, D., Rekha, K. y Ashok, M. 2016. Does *Bougainvillea spectabilis* protect swiss albino

mice from aflatoxin-induced hepatotoxicity?. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 4: 250-257.

Pantidos, N. y Horsfall, L.E. 2014. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology. 5(5): 1-10.

Pareek, N., Dhaliwal, A.S. y Malik, C.P. 2012. Biogenic synthesis of silver nanoparticles, using *Bougainvillea spectabilis* Willd. bract extract. National Academy Science Letters. 35: 383–388.

Samberg, M.E., Oldenburg, S.J. y Monteiro-Riviere, N.A. 2010. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. Environmental Health Perspectives. 118(3): 407-413.

Shaik, M.R., Albalawi, G.H., Khan, S.T., Khan, M., Adil, S.F., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Siddiqui, M.R.H., Alkhathlan, H.Z. y Khan, M. 2016. "Miswak" based green synthesis of silver nanoparticles: Evaluation and comparison of their microbicidal activities with the chemical synthesis. Molecules. 21(11): 1-15.

Shannahan, J.H., Podila, R., Aldossari, A.A., Emerson, H., Powell, B.A., Ke, P.C., Rao, A.M. y Brown, J.M. 2015. Formation of a protein corona on silver nanoparticles mediates cellular toxicity via scavenger receptors. Toxicological Sciences. 143(1): 136-146.

Tamilselvan, A., Srividhya, P., Karuthapandian, S. y Mehalingam, P. 2016. Plant - Driven to synthesis of silver nanoparticles using *Crataeva religiosa* Hook & Frost and its utility in detecting antimicrobial and antioxidant assay. International Journal of Green and Herbal Chemistry. 5: 390-402.

Villanueva-Ibáñez, M., Yañez-Cruz, M. G., Álvarez-García, R., Hernández-Pérez, M.A. y Flores-González, M.A. 2015. Aqueous corn husk extract – mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles. Materials Letters. 152: 166-169.

Vimalkumar, C. S., Hosagaudar, V. B., Suja, S. R., Vilash, V., Krishnakumar, N. M., y Latha, P. G. 2014. Comparative preliminary phytochemical analysis of ethanolic extracts of leaves of *Olea dioica* Roxb., infected with the rust fungus *Zaghouania oleae* (EJ Butler) Cummins and non-infected plants. Journal of Pharmacognosy and phytochemistry, 3(4): 69-72.

Zhang, X.F., Choi, Y.J., Han, J. W., Kim, E., Park, J. H., Gurunathan, S. y Kim, J.H. 2015. Differential nanoreprotoxicity of silver nanoparticles in male somatic cells and spermatogonial stem cells. International Journal of Nanomedicine. 10: 1335-1357.

Zhang, X.F., Shen, W. y Gurunathan, S. 2016. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An in vitro model. International Journal of Molecular Sciences. 17(10): 1-26.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Detección del Virus de la Mancha Necrótica de Impatiens (INSV) en trips y plantas ornamentales mediante RT-LAMP

Detection of Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV) in thrips and ornamental plants by RT-LAMP

María de los Ángeles García-Chávez[1,3], Edgar Martínez-Fernández[2], Porfirio Juárez-López[3], Irán Alia-Tejacal[3]. Víctor López-Martínez[3] y Nelson Avonce[1*]

[1] Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C. P. 62209.

[2] Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C. P. 62209.

[3] Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C. P. 62209.

RESUMEN

El virus fitopatógeno INSV es transmitido por trips y es capaz de infectar un gran número de cultivos, causando enormes pérdidas tanto en hortalizas como en ornamentales. El objetivo de este trabajo fue mejorar la detección del virus INSV en diferentes especies de plantas ornamentales, por lo que se colectaron muestras tanto de trips como de plantas *de Impatiens balsamina* (balsamina), *Impatiens hawkeri* (belén), *Catharanthus roseus* (vinca), *Cyclamen persicum* (ciclamen) y *Pelargonium hortorum* (geranio) con síntomas de virosis y mediante la técnica de RT-PCR se identificaron muestras positivas que se usaron para estandarizar la técnica de RT-LAMP. Los resultados muestran que el empleo del RT-LAMP permite la detección del virus de una forma más simple y es 60 veces más sensible que el RT-PCR.

Palabras clave: Amplificación isotérmica mediada por bucle, RT-PCR, diagnóstico, virus

ABSTRACT

The phytopathogenic impatiens necrotic spot virus (INSV) is transmitted by thrips and its capable of infecting many crops, causing huge losses in both vegetables and ornamentals. The aim of this work was to improve the detection of INSV virus in different species of ornamental plants. Therefore, samples of thrips as well as of *de Impatiens balsamina* (rose balsam), *Impatiens hawkeri* (New Guinea impatiens), *Catharanthus roseus* (periwinkle), *Cyclamen persicum* (cyclamen) and *Pelargonium hortorum* (geranium) plants with symptoms of viruses were collected, and positive samples identified by RT-PCR and used to standardize the RT-LAMP technique. The results show that the use of RT-LAMP allows the detection of the virus in a simpler way and 60 times more sensitive than RT-PCR.

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification, RT-PCR, diagnostic, virus

INTRODUCCIÓN

El virus fitopatógeno de la mancha necrótica de Impatiens (Impatiens necrotic spot virus, INSV) es miembro del género Tospovirus, el cual pertenece a la familia *Tospoviridae* dentro del orden *Bunyavirales*. Este género estaba formado únicamente por el virus del bronceado del tomate (TSWV), eventualmente se agregó el TSWV-I que hoy en día se conoce como INSV (Martínez-Ochoa *et al*., 2003). El INSV es transmitido de forma persistente-propagativa mediante tisanópteros (Thysanoptera) llamados comúnmente trips, principalmente de la especie *Frankliniella occidentalis* (Pergande), aunque también se ha reportado la transmisión por *Frankliniella intonsa* (Trybom) (Sakurai *et al*., 2004) y *Frankliniella fusca* (Hinds) (Naidu, *et al*., 2001) pero de forma menos eficiente. La gama de hospederos de INSV incluye alrededor de 300 especies de plantas (Zhao *et al*., 2018), aunque era considerado un patógeno principalmente de plantas ornamentales, en años recientes ha ocasionado pérdidas en cultivos hortícolas, por ejemplo, en 2009, en la costa de California la incidencia de esta enfermedad en campos individuales de lechuga alcanzó hasta un 27 %, lo que resultó en pérdidas económicas sustanciales (Kuo *et al*., 2014). Este virus es adquirido únicamente por estadios larvales, a partir de este momento, el virus queda dentro del insecto y podrá transmitirlo por el resto de su vida; contrariamente, los trips adultos que se alimentan directamente de material vegetal infectado no pueden transmitir el virus (Whitfield *et al*., 2005).

Para la detección de INSV en tejidos vegetales se han utilizado métodos serológicos y moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) principalmente (Elliott *et al*., 2009; Blockley y Mumford, 2001; Wells *et al*., 2001). Aunque el diagnóstico en plantas es importante, el conocer si la población de trips presentes en el cultivo portan el virus es trascendental, ya que uno de los factores más relevantes en la propagación de enfermedades virales es el control de los vectores. Para detectar virus en trips se han empleado técnicas como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Srinivasan *et al*., 2012); reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Mason *et al*., 2003)

*Autor para correspondencia: Nelson Avonce
e-mail: nelson.avonce@uaem.mx
Recibido: 8 de febrero de 2024
Aceptado: 29 de abril de 2024
Publicado: 31 de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2256

y RT-PCR en tiempo real (Boonham *et al*., 2002; Rotenberg *et al*., 2009). Si bien, las técnicas moleculares ofrecen ventajas, también es cierto que aún presentan algunos inconvenientes como el requerimiento de equipo especializado y costoso (Caruso *et al*., 2023). Una alternativa que no necesita el uso de estos equipos, y que además es altamente específica y sensible es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la cual utiliza la actividad de desplazamiento de cadena de la ADN polimerasa Bst de *Bacillus stearothermophilus* para amplificar el ácido nucleico objetivo. Este tipo de PCR utiliza como mínimo cuatro iniciadores, dos externos (F3 y B3) y dos internos (FIP y BIP), estos últimos contienen secuencias en sentido y antisentido del ADN objetivo, lo que permitirá la formación de un bucle durante la reacción. Dentro de los extremos del ADN blanco se encuentran las regiones F2c y B2; dos secuencias internas a una distancia de 40 nucleótidos de los extremos F2c y B2 llamadas F1c y B1; y dos secuencias externas a los extremos F2c y B2 designadas F3c y B3. De esta forma, las secuencias del iniciador FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia complementaria a F2c (F2); por otro lado, el iniciador BIP contiene la secuencia complementaria a B1 (B1c), un espaciador de TTTT y a B2. Mientras que los dos iniciadores externos contienen a B3 y la secuencia complementaria a F3c, respectivamente (Notomi *et al*., 2000). La sensibilidad del ensayo se puede aumentar si se utiliza un par de iniciadores más llamados BL y FL (Nagamine *et al*., 2002).

El primer paso en la reacción LAMP es la hibridación del iniciador FIP con su secuencia complementaria (región F2c) en la secuencia blanco e inicia la síntesis de la cadena complementaria. En seguida el iniciador F3 se hibrida a su región complementaria (F3c), lo que lleva al desplazamiento de la hebra unida a FIP y se produce una estructura de bucle en un extremo. A continuación, BIP se une a la región complementaria (B2) en la cadena unida a FIP e inicia la síntesis de otra cadena. La nueva hebra se desplaza durante la síntesis con B3, lo que da lugar a una estructura en forma de mancuerna, que se convierte en una estructura de tallo-bucle mediante autocebado. Esta estructura actúa como plantilla para el paso de amplificación cíclica de LAMP. Las regiones F3c y B3c están ausentes en la estructura de tallo-bucle y, por lo tanto, los iniciadores F3 Y B3 ya no son necesarios para la fase cíclica de la amplificación LAMP (Notomi *et al*., 2000).

Las reacciones LAMP se pueden acoplar con una transcriptasa inversa (RT-LAMP) para transcribir una secuencia de ARN en ADN de cadena sencilla (cDNA), la cual servirá como plantilla para la síntesis de nuevas cadenas (Bhat *et al*., 2022). La visualización del producto de las reacciones LAMP se puede observar mediante la turbidez, cambio de color, agregando intercalante fluorescente a la reacción, o en geles de agarosa (Hasiów-Jaroszewska y Borodynko, 2013; Sarkes *et al*., 2020; Tanner *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2022).

RT-LAMP ofrece ventajas sobre RT-PCR ya que se lleva a cabo en menos tiempo, es más económica, además de no requerir termociclador (Romero *et al*., 2019). En este artículo se reporta la aplicación de la técnica RT-LAMP como una alternativa molecular altamente sensible, específica, y rápida para la detección de INSV en trips y plantas ornamentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de plantas y trips

Se realizaron muestreos durante los meses septiembre, octubre y noviembre de 2022, y en abril de 2023 de plantas de *I. balsamina*, *I. hawkeri*, *C. roseus*, y *P. hortorum* en dos unidades de producción localizadas en el Estado de Morelos. Se tomaron muestras de las hojas con síntomas típicos de virosis tales como manchas de color marrón o amarillo; deformación de las hojas; manchas necróticas en tallo; clorosis; mosaicos; manchas anulares de color púrpura oscuro en las hojas; y patrones de anillos; también se tomaron muestras de plantas que no presentaban síntomas de enfermedad (Figura 1). Las muestras fueron colocadas en toallitas de papel en bolsas de plástico y etiquetadas, se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Dinámica Celular-Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIDC-UAEM) donde se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. De las mismas plantas muestreadas se capturaron trips con un aspirador entomológico, los cuales también fueron trasladados al laboratorio y conservados a la misma temperatura.

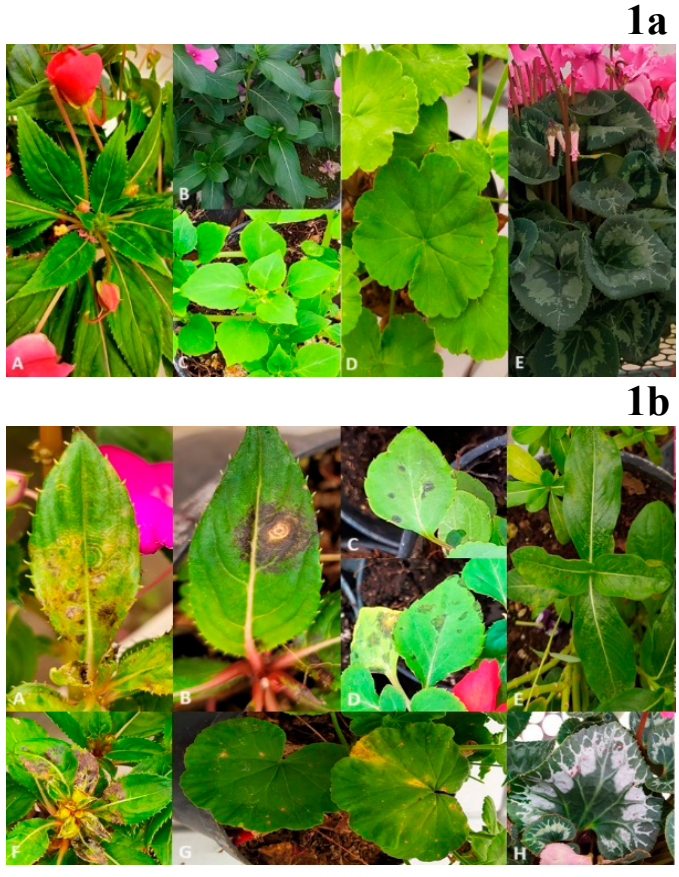


Figura 1. Plantas muestreadas.
1a. Plantas sin síntomas aparentes de virosis. A) *I. hawkeri*; B) *C. roseus*; C) *I. balsamina*; D) *P. hortorum*; E) *C. persicum*.
1b. Plantas con síntomas de virosis: A, B, F) *I. hawkeri*, C, D) *I. balsamina* E) *C. roseus*; G) *P. hortorum*; H) *C. persicum*.
Figure 1. Sampled plants.
1a. Plants without apparent virus symptoms. A) *I. hawkeri*; B) *C. roseus*; C) *I. balsamina*; D) *P. hortorum*; E) *C. persicum*.
1b. Plants with virus symptoms: A, B, F) *I. hawkeri*, C, D) *I. balsamina* E) *C. roseus*; G) *P. hortorum*; H) *C. persicum*.

Extracción de ARN de plantas y trips

La extracción de ARN para plantas se llevó a cabo con diferentes métodos: para *I. balsamina* y *P. hortorum* se empleó el protocolo establecido por Michel-López *et al*. (2018) con algunas modificaciones: en un tubo de microcentrífuga se maceraron aproximadamente 100 mg de muestra congelada en nitrógeno líquido, se agregaron 700 µL de buffer de extracción (0.25 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 % PVP (w/v), 1 % SDS (w/v)) y 700 µL de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex por 30 s, posteriormente se centrifugó 4 min a 12,800 rpm , se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:1:1), se centrifugó y transfirió la fase acuosa, se repitió la extracción, se agregó 10 % de acetato de sodio del volumen de la muestra y dos volúmenes de etanol al 100 %, se incubó 1 hora a -20 °C, se centrifugó 30 min, finalmente se realizaron tres lavados con etanol al 75 %, la pastilla fue diluida en agua y se incubó 10 min a 60 °C. La extracción de ARN de *C. roseus* fue con el reactivo Trizol, siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente, para la obtención de ARN de *I. hawkeri* y *C. persicum*, se utilizó el kit de Monarch® Total RNA Miniprep Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (NEB, 2023), y adicionando al buffer de lisis PVP al 4 %.

Para la extracción de ARN de los trips se siguió el protocolo de Boonham *et al*. (2002) aplicando algunas modificaciones: de 30-40 trips adultos se molieron en un tubo de microcentrífuga con 50 µL de buffer de extracción que contienía Tris-HCl 200 mM (pH 8.5), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS al 0.5 % (p/v), se agregaron 450 µL más del mismo buffer, la precipitación se efectuó agregando 25 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5.2). Los tubos se incubaron a -20 °C durante 90 min, posteriormente se centrifugaron durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de isopropanol (-20 °C). El contenido de los tubos se mezcló y se incubaron 30 min a -20 °C. Después se centrifugaron por 30 min, el sedimento se lavó con etanol al 70 % tres veces, se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y finalmente se resuspendió en 25 µL de agua.

La cuantificación de ARN se realizó en un espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX a 260 nm. Para corroborar la integridad del ARN se realizaron geles de agarosa al 1 %, los cuales se corrieron por 45 min a 50 V.

Condiciones de RT-PCR

La síntesis del cDNA se llevó a cabo en una reacción que contenía 2 µL de ARN, 2 µL de oligo dT (50 µM), 2 µL de buffer M-MuLV (10X), 1 µL de enzima M-MuLV (200 U/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM), en un volumen de 20 µL; la mezcla se incubó a 42 °C por 60 min, posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C por 20 min.

El cDNA obtenido de la reacción anterior se utilizó para la PCR, la cual contenía 2.5 µL del buffer de extracción, 0.65 µL de cada iniciador (10 µM), 2 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 2.5 µL de dNTPs (0.2 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa y 2 µL de cDNA. Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la PCR tanto para detectar INSV en plantas como en trips fueron las siguientes: desnaturalización inicial en 94 °C durante 5 min; 35 ciclos a 94 °C durante 60 s, 60 s a 54 °C y 60 s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Almasi y Almasi, 2018), las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de detección CFX96™. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Condiciones de RT-LAMP

Las reacciones de RT-LAMP se prepararon en un volumen de 12.5 µL que contenía 6.25 µL de WarmStart RT-LAMP 2X Master Mix, 0.25 µL del colorante fluorescente (50X), 1.25 µL de la mix de iniciadores para RT-LAMP (10X), 1 µL de cDNA, 3.75 µL de agua. Se incubaron a 65 °C por 240 ciclos de 15 s, aproximadamente 1 h en un sistema de detección CFX96™, para la lectura de la fluorescencia se utilizó el software CFX Manager™. Los iniciadores utilizados para la identificación de INSV se muestran en la Tabla 1 (Almasi y Almasi, 2018). Los productos obtenidos en esta reacción se observaron mediante un gel de agarosa, además se observó la fluorescencia de los tubos al exponerlos a luz ultravioleta.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para identificación de INSV.
Table 1. Specific oligonucleotides for INSV identification.

Iniciadores	Secuencia
INSV_F	TGATAAATAGCCAGAACTAG
INSV_R	ACTCAAAATGAAGGATCTTT
INSV_FIP	AATGGATCGGCTCTGACTGATTTTTTGAGGCAATCAAAGGGTGAC
INSV_BIP	ACCATTGCATCAAGTCTTCGTTTTTAGAAACAATTCAGAAAGAGT

Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

Para establecer la sensibilidad en la detección de INSV mediante RT-PCR y RT-LAMP, se determinó la concentración de cDNAs individuales de las muestras positivas y posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:1. Las condiciones de las reacciones de RT-PCR y RT-LAMP fueron las mismas que anteriormente se describieron.

RESULTADOS

Identificación de INSV por RT-PCR

Se realizó la extracción individual de ARN de plantas, así como la síntesis de cDNA, para eficientar la detección de virus se realizaron *pools* de cDNAs de 10 plantas (5 juegos por especie) para llevar a cabo las PCRs. De los grupos de plantas que dieron resultados positivos, se procedió al análisis individual por PCR.

INSV fue detectado únicamente en plantas de *I. hawkeri* (Figura 2a), así como en los trips colectados en este cultivo (Figura 2b). También se detectó la presencia del INSV en trips colectados en plantas de *C. persicum*, aunque en este caso el virus no fue detectado en el tejido de la planta. El resultado fue negativo para todas las muestras de los cultivos de *C. persicum*, *C. roseus*, *I. balsamina* y *P. hortorum*, así como para los trips colectados en estas plantas, excepto los de *C. persicum*.

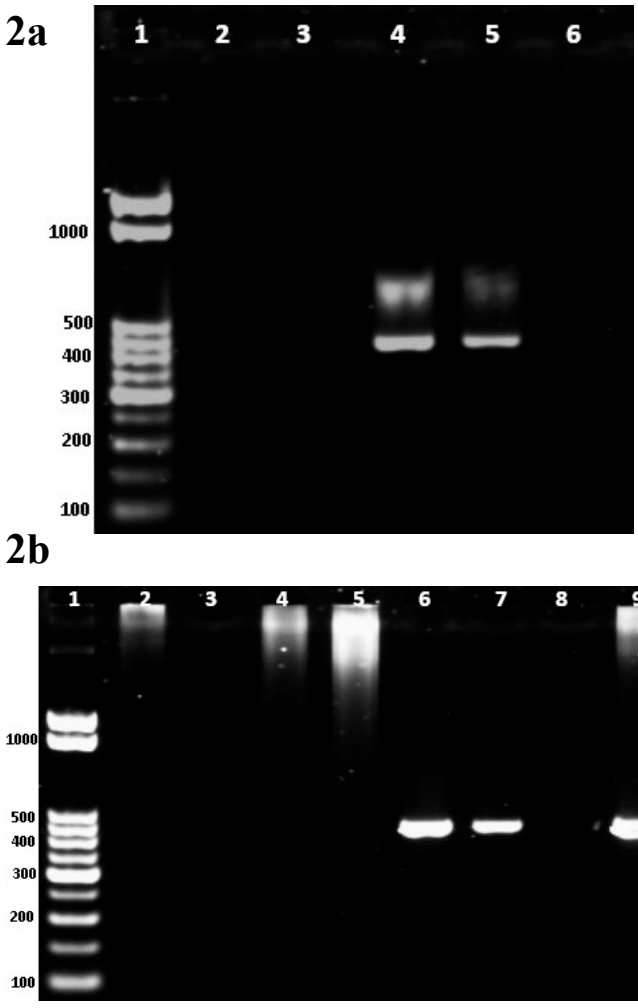


Figura 2. Identificación de INSV en plantas y trips mediante RT-PCR.
Fig 2a. Identificación de INSV en plantas de *I. hawkeri*: 1) Marcador de peso molecular; 2-5) Muestras de *I. hawkeri*; 6) Control negativo.
Fig 2b. Identificación de INSV en trips: 1) Marcador de peso molecular; 2) Trips colectados de *C. roseus*; 3) Trips colectados de *I. balsamina*; 4) Trips colectados de *I. hawkeri*; 5) Trips colectados de *P. hortorum*; 6) Trips colectados de *C. persicum*; 7) Trips colectados de *I. hawkeri*; 8) Control negativo, 9) Control positivo.
Figure 2. Identification of INSV in plants and thrips by RT-PCR.
Fig 2a. Identification of INSV in *I. hawkeri* plants: 1) Molecular weight marker; 2-5) *I. hawkeri* simples; 6) Negative control.
Fig 2b. Identification of INSV in thrips: 1) Molecular weight marker; 2) Thrips collected from *C. roseus*; 3) Thrips collected from *I. balsamina*; 4) Thrips collected from *I. hawkeri*; 5) Thrips collected from *P. hortorum*; 6) Thrips collected from *C. persicum*; 7) Thrips collected from *I. hawkeri*; 8) Negative control, 9) Positive control.

Identificación de INSV por RT-LAMP

Con las muestras de plantas y de trips identificadas como positivas a INSV en RT-PCR, se procedió a estandarizar la reacción de RT-LAMP. En la Figura 3 se muestra la detección de INSV en cDNAs de plantas (1 y 3) así como en cDNAs de trips (2 y 4), el control negativo fue cDNA de planta sana (5). La Figura 3 muestra la detección precisa de las cuatro muestras positivas, tanto las de plantas como las de trips y cero detecciones en el control negativo. La amplificación comienza a partir de los 30 min de incubación hasta los 50 min, se presentan diferencias en los tiempos de detección en

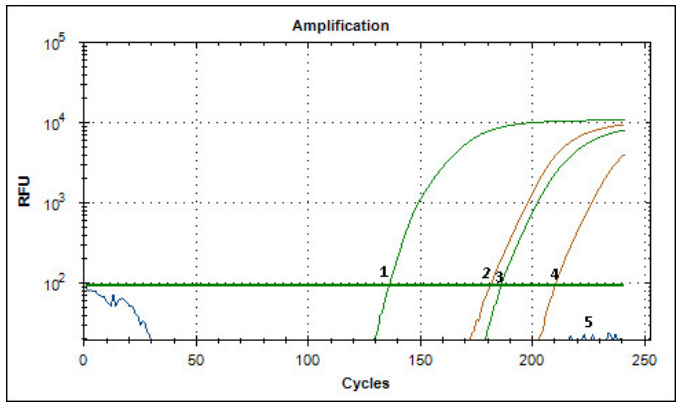


Figura 3. Identificación de INSV mediante RT-LAMP: 1,3) cDNA de *I. hawkeri*; 2,4) cDNA de trips; 5) control negativo.
Figure 3. Identification of INSV by RT-LAMP: 1,3) cDNA from *I. hawkeri*; 2,4) thrips cDNA; 5) negative control.

las muestras analizadas, lo cual probablemente se deba a las variaciones en las cargas virales presentes en cada una de las muestras.

Las muestras positivas en RT-LAMP se observaron con luz UV (Figura 4a), y los resultados se corroboraron con un gel de agarosa para observar los productos amplificados (Figura 4b). Una vez conociendo el tiempo adecuado de incubación, la reacción se puede llevar a cabo en un baño María y observar los resultados simplemente con luz UV, sin la necesidad del equipo para detectar fluorescencia.

Comparación de la sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

Para establecer la sensibilidad en la detección de INSV mediante RT-PCR y RT-LAMP se realizaron diluciones seriadas 1:1 a partir del cDNA. En la Figura 5a se muestran los resultados de la detección de INSV por RT-PCR, en donde se observa claramente una banda hasta una concentración de 0.187 mg/mL, por otro lado, mediante RT-LAMP se observó la detección del virus hasta una concentración 60 veces menor (0.003 mg/mL) (Figura 5b). Estos resultados muestran que la sensibilidad de la técnica de RT-LAMP es mayor que la obtenida con RT-PCR.

DISCUSIÓN

INSV es un virus que afecta más de 300 especies de plantas y con una amplia distribución geográfica (Zhao *et al*., 2018). Para la detección de INSV en plantas y trips se han empleado técnicas como ELISA (Wells *et al*., 2001; Sakurai *et al*., 2004) y RT-PCR (Boonham *et al*., 2002; Nekoduka *et al*., 2015), si bien, las técnicas moleculares son más sensibles que las serológicas, en los últimos años, se ha reportado que la técnica molecular RT-LAMP es aún más más sensible, rápida y económica que RT-PCR (Sarkes *et al*., 2020). En este estudio se determinó que de 30-50 min son suficientes para detectar la amplificación del producto, no obstante, se han reportado tiempos más cortos de hasta 10-12 min para la amplificación de otros virus mediante RT-LAMP (Fukuta *et al*., 2013; Suzuki *et al*., 2016; Tahzima *et al*., 2019). De acuerdo con Nagamine *et al*. (2002) para reducir el tiempo de reacción se pueden

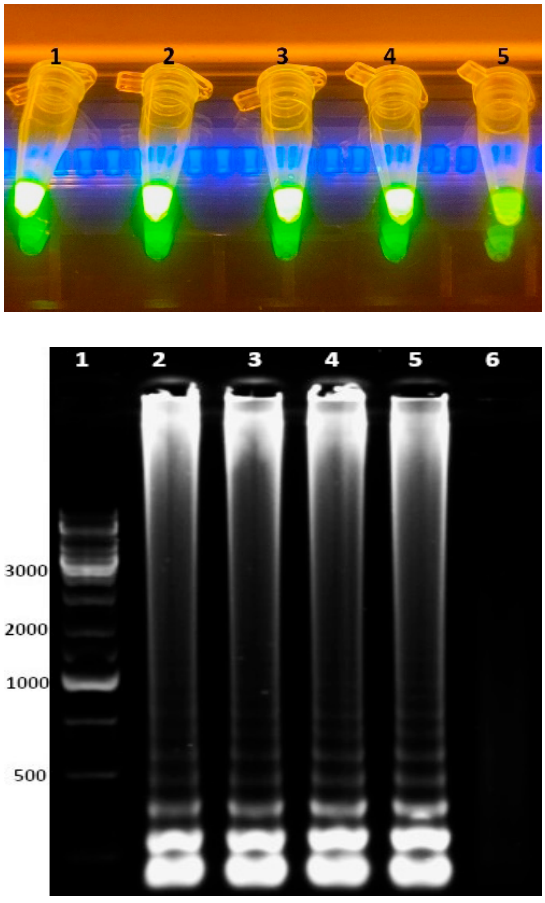


Figura 4. Visualización de reacción RT-LAMP.
4a. Visualización de reacción RT-LAMP en luz UV. 1-4) Muestras positivas, 5) Control negativo.
4b. Visualización de productos amplificados por RT-LAMP en gel de agarosa. 1) Marcador de peso molecular; 2-5) Muestras positivas; 6) Control negativo.
Figure 4. RT-LAMP reaction visualization.
4a. Visualization of RT-LAMP reaction in UV light. 1-4) Positive samples, 5) Negative control.
4b. Visualization of products amplified by RT-LAMP in agarose gel. 1) Molecular weight marker; 2-5) Positive samples; 6) Negative control.

utilizar los iniciadores de bucle (BL y FL). Por otro lado, también se han reportado tiempos mayores, de 60 y 75 min para la amplificación en RT-LAMP (Banerjee *et al*., 2016; Liu *et al*., 2019; Kokane *et al*., 2021), sin embargo, este tiempo no supera el que normalemnte se llevaría el realizar una RT-PCR que es de aproximadamente 3 h (Sarkes *et al*., 2020).

La temperatura óptima sugerida para la amplificación en RT-LAMP es de 65°C, la cual fue utilizada en este trabajo, aunque esta temperatura puede ser menor a los 65°C (Suzuki *et al*., 2016; Sui *et al*., 2018; Tiberini *et al*., 2019), o mayor (Tahzima *et al*., 2019) y amplificar el producto, sin embargo, a temperaturas muy elevadas podría causar la inactivación de la enzima o la inestabilidad de la reacción que podría afectar la estabilidad, sensibilidad y fuerza de la detección (Wei *et al*., 2012). Además de la temperatura, el tiempo de incubación también es importante en análisis RT-LAMP, a 65°C durante 30 min se observó amplificación de producto, estos resultados coinciden con los reportados por Zhang *et al*. (2011) quien detectó *Wheat yellow mosaic virus* mediante RT-LAMP a 65°C con un periodo de incubación de 30-45 min.

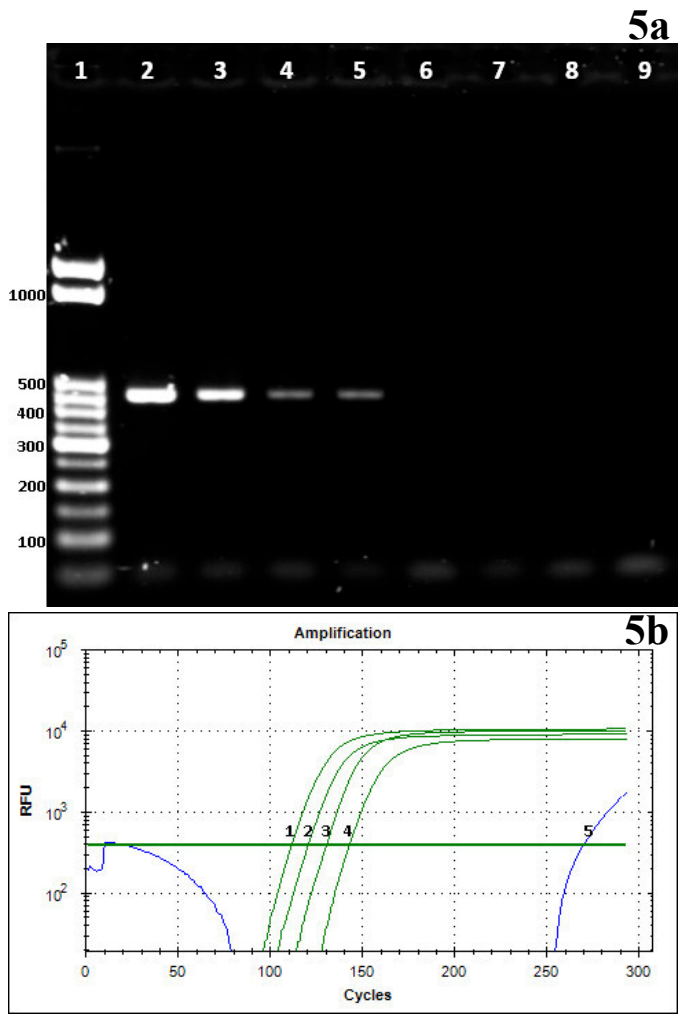


Figura 5. Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP.
5a. Detección de INSV mediante RT-PCR usando diferentes concentraciones de cDNA: 1) Marcador de peso molecular; 2) 1.5 mg/mL; 3) 0.7 mg/mL; 4) 0.375 mg/mL; 5) 0.187 mg/mL; 6) 0.093 mg/mL; 7) 0.046 mg/mL; 8) 0.023 mg/mL; 9) 0.011 mg/mL.
5b. Detección de INSV mediante RT-LAMP usando diferentes concentraciones de cDNA: 1) 0.052 mg/mL; 2) 0.026 mg/mL; 3) 0.013 mg/mL; 4) 0.003 mg/mL; 5) control negativo.
Figure 5. Sensitivity of RT-PCR and RT-LAMP.
5a. Detection of INSV by RT-PCR using different concentrations of cDNA: 1) Molecular weight marker; 2) 1.5 mg/mL; 3) 0.7 mg/mL; 4) 0.375 mg/mL; 5) 0.187 mg/mL; 6) 0.093 mg/mL; 7) 0.046 mg/mL; 8) 0.023 mg/mL; 9) 0.011 mg/mL.
5b. Detection of INSV by RT-LAMP using different concentrations of cDNA: 1) 0.052 mg/mL; 2) 0.026 mg/mL; 3) 0.013 mg/mL; 4) 0.003 mg/mL; 5) negative control.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de RT-LAMP para la identificación de INSV muestran que la sensibilidad fue 60 veces mayor que en RT-PCR, en otros ensayos realizados con virus como *Tomato chlorotic spot orthotospovirus* han encontrado que RT-LAMP es 10 veces más sensible que RT-PCR (Sui *et al*., 2018); pero para virus como *Citrus leaf blotch virus*, *Tomato brown rugose fruit virus*, y *Wheat yellow mosaic virus* la sensibilidad fue de hasta 100 veces mayor que RT-PCR (Zhang *et al*., 2011; Liu *et al*., 2019; Sarkes *et al*., 2020), mientras que para *Bean pod mottle virus*, *Apple mosaic virus* y *Prunus necrotic ringspot virus* se alcanzó una sensibilidad de

1,000 veces más sobre RT-PCR (Wei *et al*., 2012; Wani *et al*., 2023).

El diagnóstico de virosis se realiza comúnmente en tejido vegetal, en este estudio además de identificar INSV en plantas también se efectuó en trips, los cuales son los vectores naturales de este virus. Este hallazgo propone que mediante el análisis y detección de INSV en la población de trips se podrán adoptar prácticas de manejo y control tempranas para evitar la propagación del virus en el cultivo. RT-LAMP también se ha utilizado para identificar virus en áfidos (Aphidoidea) (Raigond *et al*., 2020).

Para una alerta temprana y control de enfermedades virales, es crucial contar con un método de detección rápido, preciso y con alta especificidad, RT-LAMP ha demostrado ser una técnica con estas características, además de evitar el uso de equipos costos como los termocicladores. RT-LAMP podría emplearse como técnica de diagnóstico rutinario de virus fitopatógenos y sus vectores.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que es conveniente realizar la estrategia de agrupamiento (*pooling*) de muestras descrita en este trabajo, ya que permitió el análisis masivo de muestras y la identificación precisa de las muestras infectadas con los virus, todo esto con una reducción del 30 % en la inversión económica necesaria para el análisis.

La técnica de RT-LAMP demostró ser una herramienta altamente sensible y rápida para la detección de INSV tanto en muestras de tejido vegetal como en trips, superando significativamente la sensibilidad y el tiempo requerido en comparación con RT-PCR. La detección de INSV en trips, incluso cuando las plantas son negativas al virus, sugiere un riesgo potencial de transmisión y destaca la importancia de la vigilancia temprana de los vectores para implementar medidas preventivas eficaces en la protección de cultivos. La aplicación de RT-LAMP como técnica de diagnóstico rutinario para INSV y otros virus fitopatógenos se muestra prometedora, ofreciendo resultados confiables con ventajas significativas en términos de sensibilidad, rapidez y costo en comparación con las técnicas convencionales de diagnóstico. Esto sugiere su potencial para mejorar la capacidad de respuesta ante brotes virales en la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo mediante los fondos de la Convocatoria para el financiamiento de proyectos de investigación en Ciencia de Frontera 2022.

La primera autora agradece al CONAHCyT por el otorgamiento de una beca para realizar sus estudios de Posgrado en el programa de Doctorado de Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en esta publicación.

REFERENCIAS

Almasi, M. A., y Almasi, G. 2018. Colorimetric immunocapture loop mediated isothermal amplification assay for detection of Impatiens necrotic spot virus (INSV) by GineFinder™ dye. European Journal of Plant Pathology, 150(2), 533–538. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1294-6

Banerjee, A., Roy, S., Sharma, S. K., Dutta, S. K., Chandra, S., y Ngachan, S. V. 2016. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of Chilli veinal mottle virus. Archives of Virology, 161(7), 1957–1961. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2850-7

Bhat, A. I., Aman, R., y Mahfouz, M. 2022. Onsite detection of plant viruses using isothermal amplification assays. Plant Biotechnology Journal, 20(10), 1859–1873. https://doi.org/10.1111/pbi.13871

Blockley, A. L., y Mumford, R. A. 2001. Identification and isolation of Impatiens necrotic spot virus from prickly pear cactus (*Opuntia microdasys*). Plant Pathology, 50(6), 805. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00628.x

Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., y Barker, I. 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods, 101(1–2), 37–48. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9

Caruso, A. G., Ragona, A., Bertacca, S., Montoya, M. A. M., Panno, S., y Davino, S. 2023. Development of an in-field real-time LAMP assay for rapid detection of Tomato leaf curl new delhi virus. Plants, 12(7). https://doi.org/10.3390/plants12071487

Elliott, D. R., Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Tang, J., y Alexander, B. J. R. 2009. Investigation of Impatiens necrotic spot virus outbreak in New Zealand. Australasian Plant Pathology, 38, 490–495.

Fukuta, S., Tamura, M., Maejima, H., Takahashi, R., Kuwayama, S., Tsuji, T., Yoshida, T., Itoh, K., Hashizume, H., Nakajima, Y., Uehara, Y., y Shirako, Y. 2013. Differential detection of Wheat yellow mosaic virus, Japanese soil-borne wheat mosaic virus and Chinese wheat mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. Journal of Virological Methods, 189(2), 348–354. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.005

Hasiów-Jaroszewska, B., y Borodynko, N. 2013. Detection of Pepino mosaic virus isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology, 158(10), 2153–2156. https://doi.org/10.1007/s00705-013-1706-7

Kokane, A. D., Kokane, S. B., Warghane, A. J., Gubyad, M. G., Sharma, A. K., Reddy, M. K., y Ghosh, D. K. 2021. A rapid and sensitive reverse transcription–loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of Indian citrus ringspot virus. Plant Disease, 105(5), 1346–1355. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE

Kuo, Y. W., Gilbertson, R. L., Turini, T., Brennan, E. B., Smith, R. F., y Koike, S. T. 2014. Characterization and epidemiology of outbreaks of Impatiens necrotic spot virus on lettuce in Coastal California. Plant Disease, 98(8), 1050–1059. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0681-RE

Liu, H., Wu, W., Tan, J., Li, Y., Mi, W., Jiang, L., y Wu, Y. 2019. Development and evaluation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of Citrus leaf blotch virus. Journal of Virological Methods, 270, 150–152. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.009

Martínez-Ochoa, N., Csinos, A. S., Whitty, E. B., Johnson, A. W., y Parrish, M. J. 2003. First report on the incidence of mixed infections of Impatiens necrotic spot virus (INSV) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) in tobacco grown in Georgia, South Carolina, and Virginia . Plant Health Progress, 4, 33–34. https://doi.org/10.1094/php-2003-0417-01-hn

Mason, G., Roggero, P., y Tavella, L. 2003. Detection of Tomato spotted wilt virus in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 109, 69–73. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00048-X

Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., y Bermúdez-Guzmán, M. D. J. 2018. Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(6), 1259–1267. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788

Nagamine, K., Hase, T., y Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes, 16(3), 223–229. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415

Naidu, R.A., Deom, C.M., y Sherwood, J.L. 2001. First report of *Frankliniella fusca* as a vector of Impatiens necrotic spot tospovirus. Plant Dis. 85: 1211.

New England Biolabs Inc. (NEB). Quick Protocol for Total RNA Extraction (NEB #T2010). [Consultado 3 octubre 2023]. (2023). Disponible en: https://international.neb.com/protocols/2017/11/28/quick-protocol-for-monarch-total-rna-miniprep-kit-neb-t2010

Nekoduka, S., Kobayashi, K., Fuji, S. I., Okuda, M., y Sano, T. 2015. Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. Journal of General Plant Pathology, 81(6), 429–438. https://doi.org/10.1007/s10327-015-0615-x

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., y Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12), e63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63

Raigond, B., Verma, A., Pathania, S., J, S., Kochhar, T., y Chakrabarti, S. K. 2020. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of potato virus a in potato and in insect vector aphids. Crop Protection, 137. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105296

Romero, J. L. R, Carver, G. D., Arce Johnson, P., Perry, K. L., y Thompson, J. R. 2019. A rapid, sensitive and inexpensive method for detection of Grapevine red blotch virus without tissue extraction using loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology, 164(5), 1453-1457. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04207-y

Rotenberg, D., Kumar, N. K. K., Ullman, D. E., Montero-Astúa, M., Willis, D. K., German, T. L., y Whitfield, A. E. 2009. Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. Phytopathology, 99(4), 404–410. https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0404

Sakurai, T., Inoue, T., y Tsuda, S. 2004. Distinct efficiencies of Impatiens necrotic spot virus transmission by five thrips vector species (Thysanoptera: Thripidae) of tospoviruses in Japan. Applied Entomology and Zoology, 39, 71–78. https://doi.org/10.1303/aez.2004.71

Sarkes, A., Fu, H., Feindel, D., Harding, M., y Feng, J. 2020. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). PLoS ONE, 15(6), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230403

Srinivasan, R., Sundaraj, S., Pappu, H. R., Diffie, S., Riley, D. G., y Gitaitis, R. D. 2012. Transmission of iris yellow spot virus by *Frankliniella fusca* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). Journal of Economic Entomology, 105, 40–47. https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results

Sui, X., Zhang, S., Wu, Z., y Ling, K. S. 2018. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for species-specific detection of tomato chlorotic spot orthotospovirus. Journal of Virological Methods, 253, 56–60. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.002

Suzuki, R., Fukuta, S., Matsumoto, Y., Hasegawa, T., Kojima, H., Hotta, M., y Miyake, N. 2016. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of Chrysanthemum stem necrosis virus in chrysanthemum and tomato. Journal of Virological Methods, 236, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.005

Tahzima, R., Foucart, Y., Peusens, G., Beliën, T., Massart, S., y De Jonghe, K. 2019. New sensitive and fast detection of Little cherry virus 1 using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Journal of Virological Methods, 265, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.019

Tanner, N. A., Zhang, Y., y Evans, T. C. 2015. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. BioTechniques, 58(2), 59–68. https://doi.org/10.2144/000114253

Tiberini, A., Tomlinson, J., Micali, G., Fontana, A., Albanese, G., y Tomassoli, L. 2019. Development of a reverse transcription-loop- mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of onion yellow dwarf virus. Journal of Virological Methods, 271. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113680

Wani, L. A., Jawa, P., y Khan, J. A. 2023. Development of one step colorimetric RT-LAMP assays for rapid detection of Apple mosaic virus and Prunus necrotic ringspot virus. Journal of Virological Methods, 316, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114729

Wei, Q. W., Yu, C., Zhang, S. Y., Yang, C. Y., Miriam, K., Zhang, W. N., Dou, D. L., y Tao, X. R. 2012. One-step detection of Bean pod mottle virus in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. Virology Journal, 9(187). https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-187

Wells, M. L., Pappu, H. R., Culbreath, A. K., Todd, J. W., y Brown, S. L. 2001. Field survey of Impatiens necrotic spot virus in Georgia peanut. Peanut Science, 28, 34–37. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-28-1-9

Whitfield, A. E., Ullman, D. E., y German, T. L. 2005. Tospovirus-thrips interactions. Annual Review of Phytopathology, 43, 459–489. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017

Zhang, J., Hou, Q., Ma, W., Chen, D., Zhang, W., Wubshet, A. K., Ding, Y., Li, M., Li, Q., Chen, J., Dai, J., Wu, G., Zhang, Z., Zaberezhny, A. D., Pejsak, Z., Tarasiuk, K., Zafar Khan, M. U., Wang, Y., He, J., y Liu, Y. 2022. A naked-eye visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with sharp color changes for potential pen-side test of foot-and-mouth disease virus. Viruses, 14(9). https://doi.org/10.3390/v14091982

Zhang, Z.-Y., Liu, X.-J., Li, D.-W., Yu, J.-L., y Han, C.-G. 2011. Rapid detection of Turnip mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Virology Journal, 8(550). https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-422X-8-55012227

Zhao, K., Margaria, P., y Rosa, C. 2018. Characterization of the first complete genome sequence of an Impatiens necrotic spot orthotospovirus isolate from the United States and worldwide phylogenetic analyses of INSV isolates. BMC Research Notes, 11, 1–8. https://doi.org/10.1186/s13104-018-3395-5

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Propiedades físicas y químicas de sustratos formulados con bagazo de agave y corteza de pino sometidos a explosión con vapor

Physical and chemical properties of substrates formulated with agave bagasse and pine bark subjected to steam explosion

Juan Manuel Ruvalcaba-Barrios[1]✉, Eduardo Salcedo-Pérez[1]*✉, Laura Liliana Acosta-Sotelo[1]✉, José Anzaldo-Hernández[2]✉, Víctor Manuel Ordaz-Chaparro[3]✉, Diego Raymundo González-Eguiarte[1]✉ y Ramón Rodríguez-Macías[1]*✉

[1] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, 44600, Zapopan, Jalisco, México.

[2] Departamento de Madera, Celulosa y Papel. Universidad de Guadalajara Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, 44600, Zapopan, Jalisco, México.

[3] Posgrado de Edafología. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 56230 Montecillo Estado de México.

ABSTRACT

In Mexico, the tequila and sawmill industries generate large volumes of agave bagasse and pine bark, which can be processed through steam explosion, allowing them to be utilized more quickly and with greater efficiency. The objective was to evaluate the physical and chemical properties of six substrates formulated with agave bagasse and pine bark, subjected to the steam explosion technique. The evaluated substrates contained different proportions of agave bagasse (BA), pine bark (CP), perlite (P), peat (T), and vermiculite (V), resulting in six treatments under a completely randomized experimental design. Physical and chemical properties were evaluated, as well as an image analysis using scanning electron microscopy. The image analysis results demonstrated that modifying the lignocellulosic matrix improves the materials' properties for use as a substrate. Significant statistical differences were found between treatments in all physical and chemical properties. The treatments (substrates) containing less than 75 % agave bagasse or pine bark showed better physical properties, which were reflected in a more favorable water retention curve, similar to the control treatment (70 % peat).

Keywords: *Agave tequilana* Weber; moisture retention curve; granulometry; porosity.

RESUMEN

En México las industrias del tequila y aserrío generan grandes volúmenes de bagazo de agave y corteza de pino; los cuales pueden ser procesados mediante la explosión con vapor, esto permite aprovecharlos en menor tiempo y con mayor utilidad. El objetivo fue evaluar propiedades físicas y químicas de seis sustratos formulados con bagazo de agave y corteza de pino, sometidos a la técnica de explosión con vapor. Los sustratos evaluados presentan diferente proporción de: bagazo de agave (BA), corteza de pino (CP), perlita (P), turba (T) y vermiculita (V), obteniendo seis tratamientos, bajo un diseño experimental completamente al azar. Se evaluaron propiedades físicas y químicas; así como un análisis de imagen con microscopia electrónica de barrido. Los resultados del análisis de imagen demuestran que la modificación de la matríz lignocelúlosica favorece las propiedades de los materiales para emplarlo como sustrato. Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en todas las propiedades físicas y químicas. Los tratamientos (sustratos) que presentaron una proporción menor al 75 % de bagazo de agave o corteza de pino mostraron mejores propiedades físicas que se vieron reflejadas en un mejor comportamiento en la curva de retención de agua, similar al tratamiento control (70 % turba).

Palabras clave: *Agave tequilana* Weber; curva de retención de agua; granulometría; porosidad.

INTRODUCCIÓN

Existe una creciente demanda de sustratos para producción agrícola a nivel mundial, pero a la vez el acceso a los principales materiales empleados como sustratos (turba y fibra de coco) se ha restringido. La sobreexplotación de la turba ha ocasionado el agotamiento de turberas y por lo tanto un incremento importante en su precio al igual que la fibra de coco (Herrera *et al*., 2008). Por lo anterior, se hace necesario la búsqueda de materias primas, materiales o residuos que puedan sustituir o competir con las propiedades adecuadas de la turba para su uso como sustrato agrícola o forestal que puedan cubrir la creciente demanda de sustratos para la producción de alimentos (Tzortzakis *et al*., 2020).

En este sentido, los materiales alternativos deben obtenerse de forma sustentable y en cantidades suficientes para cubrir la demanda; además deben presentar propiedades físicas y químicas que permitan el adecuado desarrollo de las plantas (Cruz *et al*., 2016). Los materiales lignocelúlosicos derivados de diferentes agroindustrias pueden ser buenas alternativas a la turba y fibra de coco, siempre y cuando se procesen de manera adecuada. En este sentido en 2023 la industria tequilera requirió de 2. 28 millones de toneladas de agave para producir 598.7 millones de litros de tequila y tequila 100 % (CRT, 2024), del volumen de agave procesado el 40 % corresponde a un residuo conocido como "bagazo de agave".

*Autor para correspondencia: Ramón Rodríguez-Macías y Eduardo Salcedo-Pérez
Correo-e: ramonrod@cucba.udg.mx y eduardo.salcedo@academicos.udg.mx
Recibido: 2 de julio de 2024
Aceptado: 5 de noviembre de 2024
Publicado: 6 de diciembre de 2024

En la producción agrícola el bagazo de agave en forma de composta es utilizado como sustrato para la germinación y cultivo de diferentes especies vegetales en contenedor (Raviv y Leith, 2008; Estévez *et al*., 2009; Crespo *et al*., 2018) y como mejorador de suelo (Acosta *et al*., 2023), sin embargo, este aprovechamiento es mínimo. El mayor volumen de bagazo de agave se deposita a cielo abierto (Martínez *et al*., 2013) o se utiliza como combustible de calderas de biomasa para la misma industria (López y Sainz, 2011), lo que genera contaminación ambiental (Merino, 2012). Por otro parte, Rodríguez (2004) reportó que la composta de bagazo de agave presenta características similares a la turba de *Sphagnum* (*peat moss*) por lo cual este material podría ser un sustrato alternativo y cubrir el déficit actual de estos productos.

Por otro lado, la industria forestal genera grandes volúmenes de corteza de diversas especies de pino (*Pinus* spp.) con potencial para aprovechamiento como sustrato agrícola (Saldaña *et al*., 2022). Actualmente se emplea para la producción de plántulas de pinos, orquídeas (*Cyrtopodium hatschbachii* Pabst) y *Cedrela odorata L* en contenedor (Mateo *et al*., 2014; Bernaola *et al*., 2015; Duarte *et al*., 2021).

Sin embargo, tanto el bagazo de agave como la corteza de pino sin ningún tratamiento no reúnen características adecuadas para ser empleados como sustratos para el crecimiento vegetal; por lo que es necesario someterlos a un proceso de transformación no solo biológica como es el compostaje; el cual requiere un amplio espacio de terreno, maquinaria de volteo y transporte, y al menos de 160 días de procesamiento.

Por lo tanto, consideramos que la técnica de explosión con vapor puede ser un proceso de transformación de materiales lignocelulósicos de forma efectiva y eficiente en comparación con el compostaje. Este proceso consiste en someter el material a una presión elevada mediante vapor saturado de agua y una despresurización súbita que permite modificar la estructura de la pared celular de los materiales lignocelulósicos (Grous *et al*., 1986), la lignina es re-localizada sobre la superficie de las fibras de celulosa (Kristensen *et al*., 2008), lo que genera una mayor área superficial, que incrementa la porosidad y retención de humedad. En este sentido, no existen evidencias de que se haya aplicado con anterioridad para el tratamiento de bagazo de agave o corteza de pino para utilizarlos como sustratos. Con base en lo anterior, el objetivo fue evaluar propiedades físicas y químicas de cinco sustratos formulados con bagazo de agave y corteza de pino, sometidos a la técnica de explosión con vapor, con la finalidad de usarlos como sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases; en la primera se determinaron las condiciones de tiempo, temperatura y presión más adecuadas para transformar el bagazo de agave y la corteza de pino mediante el cálculo del factor de severidad requerido para estos materiales sin llegar a su degradación. Para la fase dos, se formularon y caracterizaron física y químicamente cinco distintos tratamientos (sustratos) a partir de la mezcla de diferentes proporciones de bagazo de agave y corteza de pino procesada por explosión con vapor.

Fase I transformación de bagazo de agave y corteza de pino con la técnica explosión con vapor

La transformación de bagazo de agave y corteza de pino mediante la técnica de explosión con vapor, para determinar las condiciones adecuadas del proceso para estos materiales, se desarrolló en el Departamento de Madera Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara en Zapopan, Jalisco, México. Coordenadas Latitud 20°44′41.5″N, Longitud 103°30′48.7″O.

Se aplicó el proceso de transformación de explosión con vapor a tres tipos de bagazo de agave provenientes de distinto proceso de cocción y de obtención de carbohidratos (mampostería, autoclave y difusor); además, dos tipos de corteza de pino de dos diferentes especies (*Pinus oocarpa*, *Pinus leiophyla*).

Técnica del proceso explosión con vapor

Tanto el bagazo de agave como la corteza de pino se depositaron, en fases separadas, en un reactor vertical de 50 L de capacidad con la humedad de origen; (bagazo de agave 65 – 75 %; corteza de pino 50 %). Posteriormente se tapó el reactor y se abrió la válvula de paso del vapor hasta alcanzar las condiciones establecidas en el cálculo del factor de severidad. Acto seguido se despresurizó el sistema súbitamente, abriendo la válvula tipo bola de la parte inferior del reactor, lo que provocó que el material se expandiera saliendo eyectado hacia un depósito de mayor volumen, lo cual, usualmente, genera una explosión debida a la diferencia de presiones entre el reactor y el ambiente.

El procedimiento continuó luego de 48 h porque el material requiere de un periodo de inmersión en agua corriente, seguido de un triple lavado manual sobre un cedazo con malla de 3 mm, donde se elimina tanto médula, azúcares solubles y compuestos fenólicos. Posteriormente, el material pretratado se secó al sol por 48 horas en capas delgadas (5 cm) sobre un plástico, con volteos manuales de las fibras hasta su deshidratación. El proceso de acondicionamiento del material finalizó al pasarlo por un molino de martillos con aperturas de malla de 0.635 cm; el material resultante se almacenó en bolsas plásticas.

Cálculo del factor de severidad para el bagazo de agave y la corteza de pino procesados con la técnica de explosión con vapor

El factor de severidad se emplea para interpretar el grado de hidrolisis del bagazo de agave y de la corteza de pino, combinando los efectos de la temperatura y el tiempo de reacción como un único parámetro. El cálculo de la severidad se hizo usando la expresión (1) (Jacquet *et al*., 2011).

$$S = Log10 \int t2\ t1\ exp\ [T\ (t) - 100/14.75]\ dt \quad (1)$$

S: factor de severidad; T (t): temperatura del proceso (°C); t: tiempo de residencia

(minutos); (14.75): constante de energía de activación (Ley de Arrhenius).

Una vez determinado el factor de severidad adecuado para transformar el bagazo de agave y la corteza de pino mediante la técnica de explosión con vapor se procesaron tres tipos de bagazo de agave y dos tipos de corteza de pino para la caracterización lignocelulósica antes y después de explosión con vapor.

Caracterización lignocelulósica

A los cinco materiales procesados se les realizó la caracterización lignocelulósica antes y después del proceso de explosión con vapor mediante las Normas TAPPI (T 203 os 74 y T 222 os 74) para determinar el contenido de celulosa y lignina.

Microscopia electrónica de barrido

Se empleó un microscópico electrónico de barrido MEB (JEOL-6610LV) para analizar los cambios en la morfología tanto de fibras del bagazo de agave como de la corteza de pino antes y después de la técnica de explosión con vapor.

Una vez determinado el factor de severidad que definió las condiciones de temperatura, presión y tiempo requeridos para procesar los materiales, continúo la caracterización lignocelulósica para elegir los materiales con las mejores propiedades para procesar la cantidad necesaria de estos materiales requeridos para llevar a cabo la fase II.

Fase II formulación y evaluación de sustratos a base de bagazo de agave y corteza de pino procesados con explosión con vapor

Se consideraron seis tratamientos de los cuáles, cinco de ellos presentaban en su mezcla bagazo de agave o corteza de pino procesados con explosión con vapor; además de un tratamiento considerado como control sin bagazo de agave y sin corteza de pino establecido como adecuado para la producción de plántula en la empresa donde se llevó a cabo el trabajo. Cada tratamiento está representado por un tipo de sustrato diferente y cada sustrato (tratamiento) consistió en una mezcla de materiales bajo una proporción de sólido/sólido (Tabla 1). Los tratamientos (sustratos) se caracterizaron en el laboratorio de física de suelos en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en Texcoco Estado de México.

Caracterización física de los sustratos

La densidad aparente (DA) y la porosidad fueron evaluadas con la metodología propuesta por Landis *et al.* (1990).

Densidad aparente (DA) $Da = \frac{\text{Peso seco del sustrato (g)}}{\text{volumen total del envase (cm}^3\text{)}}$

Porosidades

Porosidad total PT %$= \frac{\text{Peso sustrato saturado - Peso sustrato seco}}{\text{volumen envase}} * 100$

Porosidad de aireación PA%$= \frac{\text{Peso sustrato saturado} - \text{Peso sustrato drenado}}{\text{volumen envase}} * 100$

Porosidad de retención de humedad (PRH %)$= PT\ \% - PA\ \%$

Tabla 1. Proporciones de materiales de las mezclas seleccionadas como sustratos.
Table 1. Proportions of materials of the mixtures selected as substrates.

Tratamientos (Mezcla/ sustrato)	Bagazo de agave (% v/v)	Corteza de pino (% v/v)	Turba (% v/v)	Perlita (% v/v)	Vermiculita (% v/v)
S0	0	0	70	20	10
S1	25	75	0	0	0
S2	75	25	0	0	0
S3	50	0	0	50	0
S4	100	0	0	0	0
S5	0	100	0	0	0

S0 = 70 % turba: 20 % perlita : 10 % vermiculita; S1 = 25 % bagazo de agave : 75 % corteza de pino; S2 = 75 % bagazo de agave : 25 % corteza de pino; S3 = 50 % bagazo de agave: 50 % perlita; S4 = 100 % bagazo de agave; S5= 100 % corteza de pino.

Se utilizaron envases de 230 mL, los cuales se etiquetaron y pesaron antes de ser llenados; posteriormente cada sustrato se saturó por 24 h, luego se colocó en el envase, tomando el peso. Después se drenó el agua de los envases, obteniendo el peso de sustrato drenado. Cada muestra se colocó dentro de una estufa de secado a 70 °C por 72 h, y por último se obtuvo el peso seco de las muestras de sustratos.

Curvas de retención de agua

Se determinaron las curvas de retención de agua de los sustratos, usando el método de batería de embudos de succión con placa filtrante desarrollado por De Boodt *et al*., (1974); esta técnica se basa en someter a distintas tensiones el material colocado (sustrato) en cada embudo y a su vez conectado a una manguera con agua que se desplaza a distinta altura segun la medición que corresponda; para cada medición se genera una tensión diferente, la cual permite generar la gráfica con el comportamiento de la disponibilidad de agua para cada tratamiento (sustrato). Con esos valores se determinaron los siguientes parámetros: punto de saturación (tensión 0); agua fácilmente disponible (AFD), por diferencia del agua retenida entre 10 y 50 cm de tensión; agua de reserva (AR), por la diferencia entre 50 y 100 cm de tensión, los cualés pueden ser graficados. En cada medición se extrae una parte del material para obtener su peso en húmedo y en seco colocandolo en una estufa a 70 ºC por 24 h, para determinar los valores de porosidad y graficar las curvas de retencion de agua de cada uno de los tratamientos.

Granulometría. La distribución del tamaño de partículas de las mezclas de sustratos se determinó en una tamizadora (Rotap RX-29), con seis tamices con apertura de malla de 4.76 a 0.25 mm, colocando 100 g de muestra de cada mezcla de sustrato, durante tres minutos (Burés, 1997).

Caracterización química

El pH y la conductividad eléctrica (CE) se determinaron por el método de extracto de saturación (Ansorena, 1994), con

un potenciómetro-conductímetro (Conductronic PC 45) en agua destilada, con una relación de 1:2 en volumen (sustrato: agua destilada) para pH; y 1:5 para CE.

Para la determinación de la proporción de materia orgánica (MO), se desecaron 5g de muestra a 105 °C hasta peso constante, para después calcinarse por 3 horas en una mufla a 350 °C, en el segundo caso. Así, MO (%) = $\frac{\text{Peso 105 °C} - \text{Peso 350 °C}}{\text{Peso 105°C}}$ (Aendekerk *et al.*, 2000).

Para obtener el porcentaje de carbono orgánico (CO %), se utilizó el método de calcinación en mufla: Muestras de 1.5 g de sustrato, primero se pasaron a estufa a 105 °C por una hora, se toma el peso seco; luego se calcinaron a una temperatura de 350 °C por 3 h; una vez calcinadas se obtuvo el peso de las muestras. Se determinaron las cenizas:

$$\text{Cenizas \%} = \frac{\text{Peso sustrato seco} - \text{peso sustrato calcinado}}{\text{peso sustrato seco}} * 100$$

Materia orgánica % = (100-cenizas %), la proporción de carbono orgánico se calculó con base en los resultados de materia orgánica mediante el factor 0.58 (Walkley y Black, 1947)

$$\text{CO \%} = \text{MO \%} * (0.58)$$

Así mismo, se determinó el contenido de nitrógeno total (NT) por el método Kjeldahl (Cottenie, 1994). Finalmente, la relación C: N se obtuvo con base en los resultados de los análisis del carbono orgánico (CO) y Nitrógeno total (NT) (Horneck y Miller, 1998).

Diseño experimental y análisis estadístico de los tratamientos (sustratos)

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con seis tratamientos (sustratos) y tres repeticiones para las variables físicas y químicas evaluadas. Los resultados de las propiedades físicas y químicas fueron sometidos a un análisis de normalidad y de varianza, así como una prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico Minitab 14 (2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados generados de la fase I en relación al proceso para la transformación de los materiales mediante la explosión con vapor, permitieron determinar las condiciones de tiempo, temperatura y presión requeridas para encontrar el valor del factor de severidad adecuado para estos materiales sin llegar a su degradación (Tabla 2).

El valor del factor de severidad (S) determinado para el bagazo de agave y corteza de pino fue de 3.82, el cual se obtuvo con las siguientes condiciones: tiempo de 5 a 25 minutos de trabajo del reactor, una presión de 5 a 15 Kg cm^{-2} y una temperatura de 185 a 195 °C. Esto está de acuerdo a lo expresado por Saddler *et al.,* (1993), quienes afirmaron que las variables importantes en el pretratamiento de explosión con vapor son; el tiempo, la temperatura, el tamaño de las astillas y el contenido de humedad.

Tabla 2. Cálculo del factor de severidad para bagazo de agave y corteza de pino.
Table 2. Calcuation of the severity factor of agave bagasse and pine bark.

Factor de severidad	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Presión (kg/cm^{-2})
2.77	20	150	10
3.65	20	180	10
3.82	**15**	**190**	**10**
3.94	10	200	10
4.12	15	200	10

En la tabla 3 se muestran los resultados de los contenidos de holocelulosa y lignina de los cinco materiales (3 bagazos de agave y 2 cortezas), antes del proceso de explosión con vapor ya presentaban diferencias entre ellos; sobresaliendo valores mayores en holocelulosa en bagazo de difusor (77 %) y Pinus *oocarpa* (74 %), de igual manera estos dos materiales presentaron los menores valores de lignina (23 y 25 %, respectivamente). Una vez que los materiales fueron sometidos al proceso de explosión con vapor, los contenidos de holocelulosa bajaron, excepto en bagazo de autoclave, en el cual se incrementó de 67 a 72 %. Por otro lado, los contenidos de lignina disminuyeron en todos los materiales después del proceso de explosión con vapor excepto en bagazo de mampostería, el cual incrementó de 34 a 38 % (Tabla 3).

El principal efecto que se logra con el proceso de explosión con vapor para la transformación de materiales lignocelulósicos a través de la descompresión súbita, es el de provocar la reducción del tamaño de la fibra del bagazo de agave y de la lámina de la corteza pino, ya que modifica la estructura de la pared celular del residuo; además, se incrementa el área superficial de las partículas después del proceso, originando un material de color marrón, lo cual es indicativo de la hidrólisis de hemicelulosa fácilmente soluble en agua y una fracción de un material insoluble en agua compuesto principalmente por celulosa, residuos de hemicelulosa y lignina (Pire y Pereira 2003; Bonfiglio *et al.*, 2019).

Microscopia electrónica de barrido

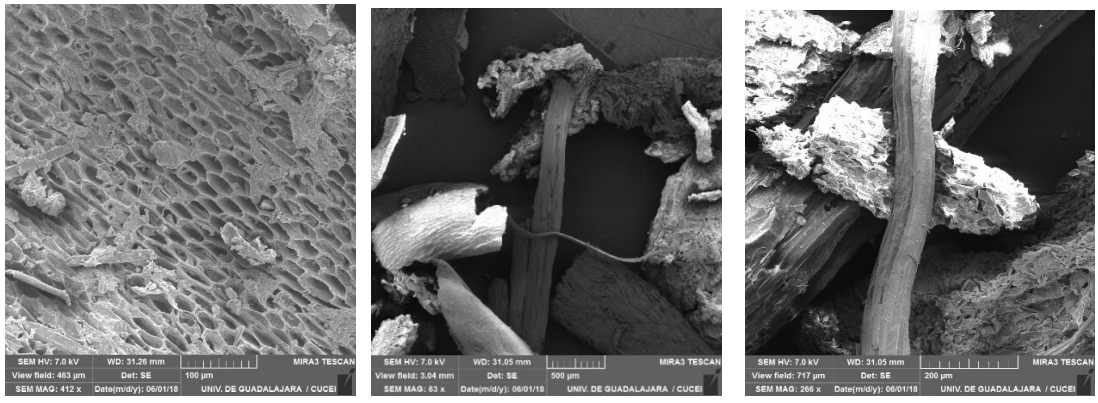
Las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (MEB) de las fibras de bagazo de agave de autoclave antes y después del proceso de explosión con vapor, muestran los cambios estructurales. En la Figura 1 (a) corresponde a tres imágenes de bagazo sin procesar donde se aprecian fibras largas, con una superficie rugosa, irregular y de color café claro. Las fibras están compuestas por una matriz de lignina y hemicelulosa, las cuales recubren las microfibras de celulosa y las mantiene aglomeradas formando una fibra entera (Rubín, 2008). La Figura 1 (b) corresponde al bagazo de agave sometido a explosión con vapor, bajo un factor de severidad S= 3.82; se aprecia mayor porosidad del material, fibras más cortas y separadas, de menor diámetro, además de fibras con fractura notable, con un tono café más oscuro (Burés, 1997).

Tabla 3. Determinación de holocelulosa y lignina de tres tipos de bagazo de agave y dos tipos de corteza de pino antes y despues del proceso de explosión con vapor.
Table 3. Holocellulose and lignin determination of three types of agave bagasse and two types of pine bark before and after the steam explosion process.

Material	Descripción	Antes de e.v. Holocelulosa (%)	Antes de e.v. Lignina (%)	Después de e.v. Holocelulosa (%)	Después de e. v. Lignina (%)
B1	Bagazo de agave cocción horno	66	34	62	38
B2	Bagazo de agave cocción autoclave	67	33	72	28
B3	Bagazo de agave difusor	77	23	74	26
P1	Pinus *oocarpa*	74	25	70	22
P2	Pinus *leiophyla*	69	28	65	25

e. v.= explosión con vapor.

a)



b)

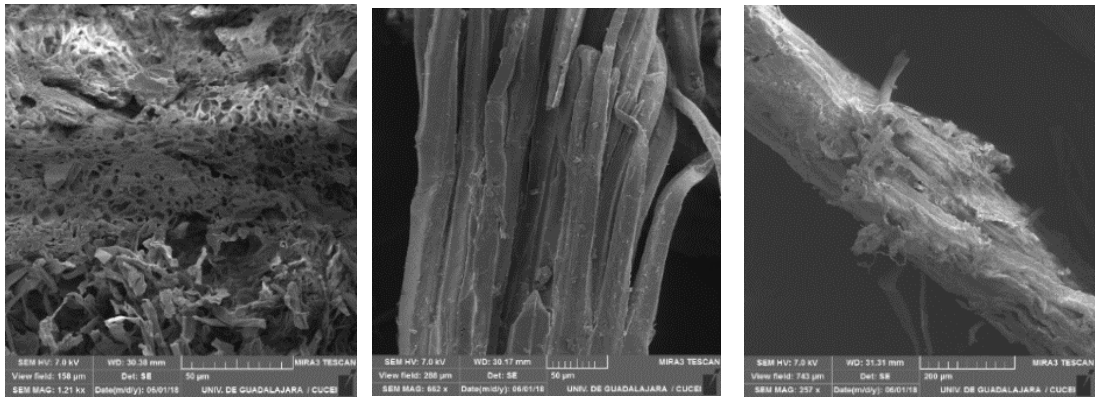


Figura 1. Bagazos de agave: sin tratamiento de explosión con vapor (a), con explosión de vapor (b).
Figure 1. Agave bagasses: without steam explosion treatment (a), with steam explosion (b).

Los resultados de la fase II permitieron caracterizar física y químicamente los seis tratamientos (sustratos).

A partir de los resultados descritos de la fase I se eligieron solo dos tipos de materiales para llevar a cabo los experimentos de la fase II que consistió en la evaluación de cinco sustratos considerados como tratamientos. Se eligió el bagazo de autoclave, ya que incrementó el contenido de holocelulosa y disminuyó el de lignina; además se consideró la corteza de *Pinus oocarpa* por presenta mayor valor de holocelulosa y menor de lignina, ambos después del proceso.

Propiedades físicas de los tratamientos (sustratos)

Distribución granulométrica. Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para la variable de distribución granulométrica (Tabla 4). Se observa que el tratamiento testigo S0 tiene el mayor porcentaje de partículas finas < 0.25 mm (21.3 %); esto concuerda con lo propuesto por Ansorena (1994), el cual establece que el sustrato con tamaño de partícula menor a 1 mm, presentó una disminución de la porosidad y aumento en la retención de agua. Cadahía (2005) y Burés (1997) mencionan que las partículas con efectos dominantes sobre la germinación de plántula son las menores a 0.5 mm. Los tratamientos S1, S5 y S4 presentaron más del 20 % de partículas menores a 1 mm y un porcentaje acumulado de 24.1, 25.7 y 33.9 %, respectivamente. La capacidad de aireación puede verse afectada por la disminución de tamaño de partícula (Prasad y Ni Chualáin, 2004).

Tabla 4. Distribución granulométrica (porcentaje con base en el peso) del tamaño de partícuas de los seis tratamientos (sustratos).
Table 4. Granulometriy (percentage based on weight) of the six treatments (substrates).

	Tamaño de partícula (mm)						
Trat.	< 0.25	0.25-0.50	0.50-1.0	1.0-2.0	2.0-3.36	3.36-4.7	> 4.7
S0	21.3	8.9	22.0	20.4	10.6	7.3	1.1
S1	5.0	3.8	15.3	19.4	17.4	20.4	3.9
S2	3.3	3.6	16.8	18.7	17.3	18.6	6.1
S3	7.5	2.3	13.9	37.7	24.0	9.3	0.23
S4	4.3	3.9	25.7	30.7	15.3	10.1	0.10
S5	6.5	3.7	15.5	25.9	18.8	13.4	3.0
CV	12.4	16.5	11.7	3.79	4.69	5.15	13

Medias con letras distintas en la misma columna, son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey (P ≤0.05); S: tratamientos (mezclas-sustratos); CV: coeficiente de variación.
Means with different letters in the same column are significantly different, according to Tukey's test (P ≤0.05); S: treatments (mixtures-substrates); CV: coefficient of variation.

El S3 registró el mayor porcentaje de partículas de 1-2 mm (37.7 %); el S4 mostró 30.7 % de peso en el mismo tamaño de partícula, lo que está dentro del rango a lo expresado por Cabrera (1999), quien manifiesta que la distribución granulométrica recomendada para la preparación de sustratos para contenedor está entre 0.5 y 2 mm. Ambas mezclas (S3 y S4) mostraron valores bajos de partículas finas (7.5 % y 4.3 %, respectivamente). Anicua *et al.,* (2009), mencionan que la granulometría favorable para retener el agua fácilmente disponible está en un mayor rango entre 0.5 y 3.36 mm. Este parámetro de granulometría no debe usarse para describir, desde el punto de vista agronómico, sustratos constituidos por mezclas de distintos materiales; esto, debido a que el comportamiento está en función de su composición, masa, densidad, compresibilidad, rugosidad, estructura interna, forma y tamaño. El tamaño es solo un factor más en esta lista (Burés, 1997).

Densidad aparente (DA). Se encontraron diferencias estadísticas significativas por efecto de los tratamientos debido a la fracción orgánica (Pire y Pereira, 2003). Se obtuvieron valores de 0.08 a 0.29 g cm^{-3} (Tabla 5) los cuales son similares a los reportados por Abad *et al.*, (1998) con valores de 0.3 y 0.8 g cm^{-3}, así mismo Handreck y Black (1994) establecen valores de 0.60 g cm^{-3} de DA para el uso de sustratos.

La constitución fibrosa de estos materiales los hace ligeros, con baja densidad aparente, factor importante para sustratos en contenedor de fácil transporte y manipulación. La DA, además, define el adecuado anclaje de las plantas; de este modo, mientras más alta es la planta, mayor deberá ser la densidad del sustrato (Abad *et al.*, 2004). La densidad aparente aumenta al disminuir el tamaño de partícula por efecto de la molienda; además, los poros se rompen y las partículas modifican su organización, por lo tanto, se reduce el espacio poroso (Ansorena, 1994).

Porosidad total (PT). El valor de las mezclas varió entre 81.9 y 92.4 % (Tabla 5), los resultados se mantuvieron dentro del rango sugerido por Morales y Casanova (2015) superiores a 85 %. Estos niveles de porosidad superiores al 80 % favorecen el crecimiento de la raíz y también el desarrollo de la parte aérea (Peñuelas y Ocaña, 1996). La porosidad total determina el porcentaje de volumen que no está ocupado por la fase sólida (Ansorena, 1994; Burés, 1997).

Porosidad de aireación (PA). Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos por efecto de la PA. El valor más bajo de porosidad de aireación se registró en S0 con 22.4 % (Tabla 5) debido al mayor volumen de partículas finas; mientras que los demás tratamientos presentaron valores entre 39.2 y 57.2 % de PA. La capacidad de retención de agua y la capacidad de aireación están relacionadas directamente con la porosidad y dependen de la distribución,

Tabla 5. Propiedades físicas de los seis tratamientos (sustratos).
Table 5.. Physical properties of the six treatments (substrates).

Tratamientos	DA (g /cm³)	PT (%)	PA (%)	PRH (%)
S0	0.12 ±0.0 d	88.5±1.35 a	22.4±2.98 d	66.1±4.33 a
S1	0.19±0.0 b	81.9±1.66 b	39.2±2.53 c	42.7±0.96 b
S2	0.16±0.01 c	92±1.15 a	51.1±1.4 b	41.0±1.98 b
S3	0.11±0.0 d	90.4 ±2.25 a	54.7 ±3.0 b	35.7±0.78 c
S4	0.08± 0.00 e	92.4±0.186 a	57.2 ±0.53 a	35.2±0.35 c
S5	0.29±0.00 a	92.1±4.47 a	57.1±1.52 a	35.2±2.95 c
CV	0.70	2.36	5.31	4.18

Medias con letras distintas en la misma columna, son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). DA: densidad aparente; PT: porosidad total; PA: porosidad de aireación; PRH: porosidad de retención de humedad; CV: coeficiente de variación.
Means with different letters in the same column are significantly different, according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). AD: bulk density; PT: total porosity; PA: aeration porosity; PRH: moisture retention porosity; CV: coefficient of variation.

composición, estructura interna, forma y tamaño de partícula, que, a la vez, determinan la relación agua-aire en el sustrato (Anicua *et al*., 2009). Es importante mencionar que no todos los poros deben de estar saturados y de este modo se permite la oxigenación de las raíces y el intercambio de gases entre la atmósfera y el sustrato; en este sentido, los valores de PA % elevados de la mayoría de las mezclas indican que existen muchos macroporos y que las raíces de las plantas tienen mucha aireación y que exista un menor volumen de agua disponible para la planta debido a que los sustratos experimentales tuvieron la menor proporción de partículas finas (4.3 – 7.5 %).

Porosidad de retención de humedad (PRH). El tratamiento testigo presentó el mayor porcentaje de PRH % con 66.1 %, esto debido al mayor volumen de partículas finas; los demás tratamientos estuvieron entre 35.2 y 42.7 % (Tabla 5). Gutiérrez *et al.*, (2011), mencionan que la PRH % disminuye cuando en el sustrato se encuentran partículas de 1 a 2 mm de diámetro.

Con estos resultados el tratamiento S0, se posicionó como la mejor mezcla con el mayor volumen de retención de humedad y por lo tanto como uno de los sustratos más empleados por los productores de plántula.

Curvas de retención de agua. Las curvas de los sustratos evaluados (Figura 2), estan integradas por los puntos de agua no disponible (AND), agua fácilmente disponible (AFD) y agua de reserva (AR), asi como el contenido de agua a saturación punto 0 de la Figura 2. De Boodt *et al.* (1974), mencionan que entre las tensiones de 10 y 50 cm se encuentra el agua facilmente disponible (AFD) y entre las tensiones de 50 y 100 cm de columna de agua, el agua de reserva (AR).

Se aprecia que el mayor valor de agua no disponible (AND) se encontró en S4 (100 % bagazo de agave), al pasar del punto de saturación de agua de 65 a 35 % a 0 y +10 cm de tensión de columna de agua respectivamente. Esto significa una pérdida de agua del 30 % debido, a la constitucion a base de fibras del bagazo de agave y al mayor tamaño de partículas, que facilitaron la percolación. El tratamiento testigo (S0) inicio con un 65 % de saturacion de agua y disminuyó a 40 %, esto es perdió solo el 25 % de agua; esto debido a la predominancia de partículas finas que retienen la humedad. Esto esta de acuerdo a lo expresado por Anicua *et al.,* (2009), al disminuir el volumen del tamaño de partícula 1–2 mm, tanto los materiales orgánicos como inorgánicos, reducen su capacidad de retención de agua y humedad volumétrica; ya que su espacio poroso total también disminuye.

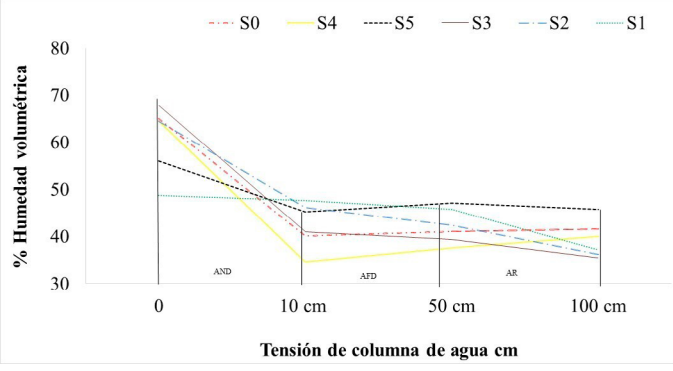


Figura 2. Curva de retención de agua de los seis sustratos (tratamientos). AND= agua no disponible; AFD= agua fácilmente disponible; AR= agua de reserva.

Figure 2. Water retention curves of the analyzed substrates. AND= water not available; AFD= readily available water; AR= reserve water.

El contenido de agua facilmente disponible (AFD) y de reserva (AR), muestran la cantidad de agua que la planta toma y las curvas generadas para los sustratos presentan un comportamiento similar para S0 y S4; con un 1 % y 3 % respectivamente; valores obtenidos al restar 40 y 41 para S0 y 35 y 38 para S4. La mezcla S1 retiene la mayor cantidad de humedad 67 % y drena a 41 % a 10 cm de tension. Dicha caída o punto de inflexión es del orden del 26 %, y en la Figura 2 se aprecia por la pendiente entre el punto 0 y 10 cm; esto se debe a la presión de entrada de aire o presión de burbuja de aire y se caracteriza por tener signo negativo; despúes del punto de tension 10 cm hasta 100 cm se aprecia una recta casi horizontal; esto está de acuerdo a lo etablecido por Gutierrez *et al.,* (2011) en curvas de retención de agua para materiales puros y mezclas de fibra de coco, piedra pómez y tezontle; y demostraron que la mezcla de material orgánico e inorgánico (75:25), presentan mayor retención incluso que la fibra de coco sola.

Segun Burés (1997), la presión minima que se debe aplicar a un sustrato para que el aire llene los poros es cuando su valor es cercano a cero. Durante la determinación de la curva de retención de agua a distintas tensiones se presentaron condiciones adversas en el manejo de los materiales como, dificultad para volver a hidratar el sustrato S0, ya que los espacios ocupados por aire, no pueden volver a saturarse de agua una vez que la han perdido (fenómeno conocido como histéresis). En este sentido, al momento de realizar los cálculos para los distintos valores de AFD y AR se obtubieron valores negativos para las mezclas S4 y S0, lo que refleja presencia de aire al momento de la lectura a los 50 y 100 cm de columna de agua, situacion que coincide con lo establecido por Burés (1997).

A partir de los resutados obtenidos de las pruebas físicas de los tratamientos (sustratos) podemos concluir que el comportamiento y las propiedades de los materiales empleados como sustratos, dependen de los siguientes aspectos:

Forma y tipo de partícula (esférica, granular, fibrosa, laminar o amorfa). Tamaño de partícula (finos menor a 1 mm, pequeña de 1 a 3 mm, media de 4 a 7 mm y grande mayor a 7 mm), así como la distribución de éstos en la matríz. Finalmente considerar su resistencia a la fragmentación o descomposición por tipo de origen (orgánico, mineral, sintético). Por lo anterior, es importante que dependiendo del proposito con el que se va a utilizar el sustrato, se debe considerar la combinación mas adecuada de los anteriores aspectos para dicho objetivo, ya que, la combinación de éstos permite que se complementen las funciones de cada uno de ellos de forma individual o en una mezcla.

Propiedades químicas de los sustratos

Materia orgánica (MO). Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) como se muestra en la tabla 6. Los mayores valores se presentaron en S2 y S4 con 94 % en ambos tratamientos. Mientras que los valores más bajos se obtuvieron en S3 y S0 con (48.6 y 74.3 %, respectivamente). Los resultados encontrados en los tratamientos S1, S2, S4 y S5 se encuentran dentro del parámetro deseable para MO en sustratos > 80 % (Ansorena, 1994). Los contenidos de MO encontrados en los tratamientos están dados por su composición química la cual se ve reflejada en una lenta mineralización (Day y Shaw, 2001).

Nitrógeno total (NT). La concentración de N en los tratamientos evaluados oscilo de 0.46 a 0.81 % como se muestra en la tabla 6. Los mayores valores se encontraron en S0 y S4 con (0.81 y 0.80 %, respectivamente); los resultados encontrados son similares a los reportados por Iñiguez *et al*., (2005) y Rodríguez *et al*. (2010) en composta de bagazo de agave con valores de 0.81 a 0.83 %, sin embargo, son mayores a los reportados por Borges *et al.,* (2003) con 0.5% de N.

Relación C: N. Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 6), encontrando que S2 y S5 fueron los que registraron los mayores valores de relación C:N (110.6 y 112.5, respectivamente), los cuales presentan alto contenido de lignina, celulosa y de compuestos de carbono recalcitrantes, lo que genera una alta relación C:N, además son resistentes a la degradación por los microorganismos (Burés, 1997; Quintero *et al.*, 2011). Mientras que los valores más bajos se obtuvieron S3 y S0 con una relación C:N (44 y 53, respectivamente), lo anterior indica que estos materiales presentarán una rápida mineralización al presentar material orgánico poco estable (Sánchez *et al.*, 2007).

Sin embargo, los tratamientos S1, S2, S4, S5 pueden ser utilizados en la producción de planta por presentar un alto contenido de materiales orgánicos, los cuales tendrán una descomposición más lenta (Acosta *et al.*, 2023).

El pH de todos los tratamientos fue estadísticamente diferente, presentando valores de 5.3 a 6.2, ya que, este influye en la disponibilidad de nutrientes del sustrato a la planta (Tabla 6). Por lo anterior, Landis *et al.,* (1990) mencionan que al utilizar sustratos para la producción de planta estos deben presentar un pH entre 5.5 y 6.5.

La CE todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas con valores de 0.13 a 0.40 d S m^{-1} (Tabla 6). Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Abad *et al.,* (2004) y Quintero *et al.,* (2011), quienes mencionan que los valores no deben superar los 3.5 d S m^{-1}.

CONCLUSIONES

El proceso de explosión con vapor aplicado a bagazo de agave tequilero y corteza de pino, permite una transformación química y estructural de dichos materiales, lo que genera propiedades físicas adecuadas para su uso como sustratos agrícolas alternativos a la turba y fibra de coco. Se determinó que el factor de severidad requerido para la transformación de estos materiales sin llegar a su degradación fue de S= 3.82.

Los sustratos que tuvieron en su mezcla una proporción de al menos 50 % de bagazo de agave o corteza de pino, presentaron una mejor densidad aparente en comparación cuando se emplean al 100 % independientemente del material. Con respecto a la porosidad total y porosidad de retención de humedad los tratamientos con mejores valores son los que presentaron bagazo de agave o corteza de pino en una proporción menor al 75 %; lo cual se reflejó en la curva de retención de agua.

Se recomienda, al formular un sustrato hacer mezclas de materiales orgánicos o inorgánicos con propiedades físicas que se complementen entre sí, ya que, se demostró que el tipo y la forma de la partícula; así como el tamaño y la distribución granulométrica de las mismas generaron mejores propiedades al mezclar el bagazo de agave (fibras), con la

Tabla 6. Propiedades químicas de los sustratos (tratamientos).
Table 6. Chemical properties of substrates (treatments).

Tratamiento	Cenizas	MO	COT	NT	C:N	CE	pH
	----------%----------					(d S/m)	
S0	25.7±4.8b	74.3±4.7c	43.1±2.8c	0.81±0.03a	53±1.8d	0.28±0.01c	5.3±0.04c
S1	7.8±1.5cd	92.2±1.5ba	53.5±0.8ab	0.60±0.01b	111±19a	0.23±0.01d	5.6±0.03b
S2	6.0±0.8d	94±0.8a	54.5±0.4a	0.50±0.09c	89±3.5b	0.40±0.01a	5.6±0.15b
S3	51±1.9a	48.6±1.8d	28.2±1.1d	0.65±0.05b	44±5.2d	0.40±0.01a	5.6±0.02b
S4	5.7±0.7d	94±0.7a	54.7±0.4a	0.80±0.00a	69±0.5c	0.30±0.01b	6.2±0.13a
S5	11±0.5c	89.2±0.5b	51.7±0.2b	0.46±0.00c	113±0.6a	0.13±0.01e	5.5±0.1b
CV	12.4	2.7	2.7	n/d	10.32	4.4	1.69

Medias con letra distinta en la misma columna son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). MO: materia orgánica; COT: Carbono orgánico total: NT: Nitrógeno total; C: N: relación Carbono Nitrógeno; CE: conductividad eléctrica. CV: coeficiente de variación, n/d: no disponible.
Means with different letters in the same column are significantly different, according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). OM: organic matter; COT: Organic carbon: NT: Total nitrogen; C:N: Carbon Nitrogen ratio; EC: electrical conductivity. CV: coefficient of variation.

corteza de pino (láminas) y otros materiales; además para incrementar la retención de agua, se deberá incrementar el porcentaje de partículas finas (menores a 1 mm) entre un 20 y 30 %.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por los recursos económicos para desarrollar esta investigación mediante la beca nacional recibida por el autor principal estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BEMARENA), Sede CUCBA-UDG.

A la empresa Agro Proyectos y Servicios Estratégicos y Ambientales SPR de RL (AGROASPE) por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto, el cual forma parte del registro ante el INPI con número de expediente IT/B/2019/0001390, número de solicitud IT/B/2019/000354 e identificador 6050.

CONFLICTOS DE INTERES

Los autores no expresan conflicto de interés.

REFERENCIAS

Abad, B.M., Noguera, M. y C. Carrión, B. 2004. Los sustratos en el cultivo sin suelo. (Urrestarazu G. M. ed.). Tratado de cultivos sin suelo. Mundi Prensa. Madrid, España.

Acosta, S.L.L., Zamora, N.J.F., Rodríguez, M.R., Jiménez, P.C., Gallardo, L.J.F. y Salcedo, P.E. 2023. Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 2. Dinámica de mineralización del carbono y nitrógeno. *Revista Biotecnia*. 25 (2): 5-11.

Aendekerk, G.L., Cevat, H.N., Dolmans, C., Van Elderen, J.A., Kipp, C., de Kreij, C., Sonneveld, J.B., Verhagen, G.M. y Wever, G. 2000. International substrate manual. Elsevier International. The Netherlands.

Anicua, S.R., Gutiérrez, C.M.C., Sánchez, G.P., Ortiz, S.C.A., Volke, H.V.H. y Rubiños, P.J.E. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agric. Téc. Méx*. 35: 147-156.

Ansorena M.J. 1994. Sustratos. Propiedades y Caracterización. (ed) Mundi-Prensa. Madrid, España.

Bernaola, P.R.M., Zamora, N.J.F., Vargas, R.J.J., Cetina, A.V.M., Rodríguez, M.R. y Salcedo, P.E. 2015. Calidad de planta en etapa de vivero de dos especies de pino en sistema Doble-Trasplante. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 7 (33): 74-93.

Bonfiglio, F., Cagno, M., Rey, F., Torres, M., Böthig, S., Menéndez, P. y Mussatto, S. I. 2019. Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor. *Biomass and Bioenergy*.*121*:41-47.

Borges, G.L., Soria, F.M. y Ruz, F.N. 2003. Contenido de macronutrimentos en sustratos de bagazo de henequén y excretas porcina y su efecto en el desarrollo plántulas de papaya. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 9: 291-304.

Burés, S. 1997. Sustratos. (ed). Agrotécnicas S. L. Madrid, España.

Cabrera, R.I. 1999. Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en macetas. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 5: 5-11.

Cadahia, L.C. 2005. Fertirrigación, cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. (ed.) Mundi-Prensa. Madrid, España. 681 pp.

Crespo, G.M.R., González, E.D.R., Rodríguez, M.R., Ruíz, C.J.A. y Durán, P.N. 2018. Caracterización química y física del bagazo de agave tequilero compostado con biosolidos de vinaza como componente de sustratos para cultivos en contenedor. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 34 (3) 373-382.

Cottenie, A. 1994. Workshop on standarización of analytical methods for manure, soil plant and water. Comission European Communities. FAO Soils Bulletin 38/2. pp: 28-33.

Consejo Regulador del Tequila. CRT. 2024 (consultado:28 septiembre 2024). Disponible en http: // www.crt.org. Mx/ Estadísticas CRT web/.

Cruz, C.J.M., Álvarez, S.J.M., Soria, F.M.J. y Martínez, B.C. 2016. Producción de sustratos orgánicos para ornamentales a menor costo que los importados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 25(1): 44-49.

Day, M. y Shaw, K. 2001. Biological, chemical, and physical process of composting. In: Compost utilization in horticultural cropping systems. P.J. Stoffela y B.A. Kahn (eds.). pp. 17-50. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, EUA,

De Boodt, M., Verdonck, O. y Cappaert, I. 1974. Method for measuring the waterrelease curve of organic substrates. *Acta Horticulturae*. 37, 2054-2063.

Duarte, E.R., R.ubenich, R., Thalmayr, P.G., Ortiz, L.M., Rocha, S.P., Niella, F.O. y Küppers, G. 2021. Efecto del tipo de polinización en la formacion de frutos y capacidad germinativa de las semillas de Cyrtopodium hatschbachii Pabst. *Revista Forestal Yvyrareta*. 29 (12), 43-51.

Estévez, I., Seoane, S., Núñez, A. y López, M.E. 2009. Characterization and evaluation of compost utilized as ornamental plant substrate. *Compost Sci. Utilization*. 17(4):210-219.

Grous, W.R., Converse, A.O. y Grethlein, H.E. 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb Technol*. 8:274-280.

Gutiérrez, C.M.C., Hernández, E.J., Ortiz, S.C.A., Anicua, S.R. y Hernández, L.M.E. 2011. Relación porosidad retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga. *Rev. Chap. Ser. Hort*. 17(3): 183-196.

Handreck, K.A. y Black, N.D. 1994. Growing media ornamental plants and turf. Sydney, Australia:University of New South Wales Press.Herrera, F., Castillo J. E., Chica, A. F. y López, B. L. 2008. Use of municipal solid waste compost (WSWC) as a rrowing medum in the nursey production of tomato plants. *Bioresource Thecnology*. 99: 287-296.

Horneck, D.A. y Miller, R.O. 1998 Determination of total nitrogen in plant tissue. In Y. P. Kalra (eds.) Handbook of reference methods for plant analysis, soil and plant analysis council, Inc. pp. 75-83. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Herrera, F., Castillo, J.E., Chica, A.F. y López, B.L. 2008. Use of municipal solid waste compost (MSWC) as a growing medium in the nursery production of tomato plants. *Bioresource Thecnology*. 99: 287-296.

Jacquet, N., Quiévy, N., Vanderghem, C., Janas, S., Blecker, C. y Wathelet, B. 2011. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. Polymer Degradation and Stability, 1582-1588.

Kristensen, J.B., Thygesen L.G., Felby C., Jorgensen H. y Elder T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioetanol production. Biotechnol Biofuels;(1):5

Landis, T.D., Tinus, R.W., Mc Donald, S.E. y Barnett, J.P. 1990. The Container tree nursery manual. Vol. II Containers and growing media, Agric. Handbook. 674. Washington, DC, USA: USDA, Forest Service.

López, M.M.E. y Sainz, O.M.J. (Coords). 2011. Guía de residuos orgánicos de uso agricola. Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciónes. Universidad de Santiago de Compostela.

Martínez, G.G.A., Iñiguez, C.G., Ortíz, H.Y.D., López, J.Y. y Bautista, C.M.A. 2013. Tiempos de apilado del bagazo del maguey mezcalero y su efecto en las propiedades del compost para sustrato de tomate. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29(3): 209-2016.

Mateo, S.J.J., Capulín, G.J., Araujo, S.M.R., Suárez, I.A., Mitjans, M.B. 2014. Crecimiento de *Acacia retinodes* Schltdl. en sustratos a base de aserrín de pino y envases tratados con cobre. *Revista Cubana de Ciencias Forestales.* 2(2): 191-202.

Merino, A. 2012. El bosque: sumidero de carbono y fuente de energía. Recursos Rurais Serie Cursos. 6: 107-119.

Minitab 14 2015. Languaje Pack- Español. Minitab® Inc.v.14.2.1. EUA.

Morales, M.E.R. y Casanova, L.F. 2015. Mezclas de sustratos orgánicos e inorgánicos, tamaño de partícula y proporción. Agron. Mesoam. 26: 365-372.

Peñuelas, R.J.L. y Ocaña, B.L. 1996. Cultivo de Plantas Forestales en Contenedor. Mundi-Prensa. (ed). Madrid, España. 190 p.

Pire, R. y Pereira, A. 2003. Propiedades físicas de componentes de sustratos de uso común en la horticultura del estado Lara, Venezuela: Propuesta metodológica. *Bioagro.* 15: 55-63.

Prasad, M. y Chualáin D. 2004. Relationship between particle size and air space of growing media. *Acta Hort*. 648: 161-166.

Quintero C., M.F. González M., C.A. y Guzmán P., J.M. 2011. Sustratos para cultivos hortícolas y flores de corte. In: Flórez R., V. J. (ed.). 79-108 pp. Sustratos, Manejo del Clima, Automatización Control en Sistemas de Cultivo sin Suelo. Universidad Nacional de Bogotá. Colombia.

Raviv, M. y Leith, J.H. 2008. Soilless culture: theory and practice. Elsevier, San Diego, CA, U.S.A.

Rodríguez, M.R. 2004. Desarrollo y caracterización de sustratos orgánicos a partir de bagazo de agave tequilero. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, E.M.

Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulose biofuels. Nature 4, 841-845.

Saldaña, P.E., Cruz, S.H., y Cruz, S.J. 2022. Composta a base de aserrín y excretas de bovinos. *Tendencias En energías Renovables Y Sustentabilidad*. 1(1), 368–376. https://doi.org/10.56845/terys.v1i1.210

Sánchez, H.R., Ordaz, Ch.V.M., Benedicto, V.G.S., Palma, L.D.J. y Sánchez, B.J. 2007. Chemical characteristics of several vermicompost in México. *Compost Science & Utilization*. 15(1): 47-52. https://doi.org/10.1080/10 65657X.2007.10702310.

Technical Associaton for the Pulp and Paper Industries. 1978. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. TAPPI Test Method T 222 os-74. TAPPI Press. Atlanta.

Tzortzakis, N., Nicola, S., Savvas, D. y Voogt, W. 2020. Editorial: Soilless cultivation through an intensive crop production scheme. Management Strategies, Challenges and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. (11): 363p. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.0036

Walkley, A. y Black, I.A. 1947. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. *37*(1): 29-38. https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003.

Wise, L.E., Marphy M. y de Adieco A. 1946. Clorite holocellulose, its fractiontion and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. *Paper trade Journal*. 122(2): 35:43.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Síntesis y caracterización películas poliméricas compuestas de PbI2 / PVA para su posible aplicación en dispositivos optoelectrónicos

Synthesis and characterization of PbI2/PVA composite polymer films for possible application in optoelectronic devices

Bryan Maca-Ossa[1], Jeisson Javier Solís-Mosquera[1], Dagoberto Cabrera-Germán[1], Guillermo Suárez-Campos[2], Mérida Sotelo-Lerma[1]*

[1] Mtro. en Ciencia de Materiales, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

[2] Dr. en Ciencia de Materiales, Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Se sintetizaron películas compuestas de alcohol polivinílico/yoduro de plomo (PVA/PbI_2) con diferentes concentraciones de PbI_2 utilizando un proceso de evaporación de solventes a baja temperatura y de bajo costo. Las propiedades estructurales de las partículas obtenidas fueron analizadas mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados de DRX mostraron una naturaleza predominantemente cristalina, exhibiendo los planos de reflexión característicos del politipo 2H del yoduro de plomo. Las micrografías MEB mostraron una morfología hexagonal con un tamaño promedio de partícula de 13.2 µm. Los parámetros ópticos de las películas compuestas se midieron mediante espectroscopía UV-Vis, encontrándose que la brecha de energía indirecta para el PVA puro es de 4.65 eV. En contraste, las películas de PVA/PbI_2 con concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 % en peso de PbI_2 mostró una transición directa de 5.16 eV y una transición indirecta de 4.45 eV. La resistencia eléctrica de la película de PVA se midió en 4.32×10^7 Ω. Los análisis químicos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) indicaron que la adición de partículas de PbI_2 no modifica las bandas características del PVA, lo que sugiere la ausencia de enlaces químicos entre las partículas y la matriz polimérica. Las propiedades ópticas y eléctricas obtenidas sugieren que las películas compuestas de PVA/PbI_2 tienen potencial para aplicaciones en el campo de la optoelectrónica.

Palabras clave: *Yoduro de Plomo, películas compuestas, Precipitación química,* Alcohol polivinílico*, optoelectrónico.*

ABSTRACT

Polyvinyl alcohol/lead iodide (PVA/PbI_2) composite films were synthesized with varying PbI_2 concentrations using a low-temperature, cost-effective solvent evaporation process. The structural properties of the synthesized particles were analyzed using X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). XRD results revealed a predominantly crystalline nature, displaying reflection planes characteristic of the 2H polytype of lead iodide. SEM micrographs showed a hexagonal morphology with an average particle size of 13.2 µm. The optical properties of the composite films were measured using UV-Vis spectroscopy, indicating that the indirect energy band gap for pure PVA is 4.65 eV. In contrast, PVA/PbI_2 films with 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 wt% PbI_2 exhibited a direct transition of 5.16 eV and an indirect transition of 4.45 eV. The electrical resistance of the PVA film was measured at 4.318×10^7 Ω. Chemical analysis using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy showed that the addition of PbI_2 particles did not alter the characteristic bands of PVA, suggesting no chemical bonding between the particles and the polymer matrix. The optical and electrical properties suggest that the PVA/PbI_2 composite films are promising for various optoelectronic applications.

Keywords: Lead iodide, composite films, chemical precipitation, polyvinyl alcohol, optoelectronic.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los centros médicos de primera línea cuentan con equipos diseñados para monitorear los signos vitales de los pacientes de manera constante. Durante la crisis sanitaria de finales de 2019, se hicieron evidentes las limitaciones significativas de los dispositivos de monitoreo existentes, que no solo carecían de portabilidad, sino que tampoco eran lo suficientemente versátiles para atender emergencias en diversos entornos (Lima *et al*., 2022). Esto subraya la necesidad urgente de desarrollar dispositivos médicos más ligeros, precisos y portátiles, que permitan un monitoreo más eficiente en diferentes entornos, mejorando así la atención de los pacientes en momentos de alta demanda (Martínez Márquez, 2021). Lo anterior requiere tecnologías más eficientes, como sensores flexibles y dispositivos portátiles basados en materiales avanzados, que son el objetivo de esta investigación.

Aunque los dispositivos de monitoreo convencionales cumplen su función, su diseño rígido, basado en materiales semiconductores o metálicos, presenta serias limitaciones, especialmente en aplicaciones que requieren flexibilidad y adaptabilidad mecánica (Li *et al.*, 2021). En respuesta a estas limitaciones, ha surgido una revolución en el desarrollo de sensores flexibles y dispositivos portátiles, que ofrecen ventajas como mayor capacidad de estiramiento y resistencia mecánica. Los hidrogeles, por ejemplo, se destacan por sus

*Autor para correspondencia: Mérida Sotelo-Lerma
Correo-e: merida.sotelo@unison.mx
Recibido: 13 de septiembre de 2024
Aceptado: 13 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2441

excelentes propiedades de elasticidad e hidrofilicidad, lo que los hace útiles en aplicaciones médicas como la administración de fármacos, apósitos para heridas y almacenamiento de energía (Zheng *et al*., 2020).

Sin embargo, integrar estas características en sensores de alta sensibilidad sigue siendo un desafío. Es difícil combinar flexibilidad mecánica con precisión en la detección de pequeñas deformaciones. Para superar este obstáculo, se han propuesto diversas estrategias que mejoran tanto el rendimiento mecánico como el eléctrico de los polímeros utilizados en sensores flexibles. Una de estas estrategias es la incorporación de nanomateriales en redes poliméricas, lo que no solo mejora la elasticidad, sino que también optimiza la sensibilidad de los sensores (Yuan *et al*., 2021).

En la última década, los materiales bidimensionales (2D), como el grafeno y el fósforo negro, han atraído gran atención en el campo de la electrónica debido a sus excepcionales propiedades de flexibilidad, resistencia mecánica y conductividad eléctrica (Li *et al*., 2021). Desde su descubrimiento en 2004, el grafeno ha servido como punto de referencia para el desarrollo de otros materiales 2D, lo que ha impulsado un campo emergente de investigación con un amplio potencial en diversas aplicaciones tecnológicas (Yuan *et al*., 2021). Otros materiales 2D como el nitruro de boro hexagonal y los calcogenuros de metales de transición también han sido objeto de estudio debido a su potencial en nanoelectrónica, optoelectrónica y dispositivos flexibles (Yuan *et al*., 2020; Li *et al*., 2021). Siguiendo esta tendencia, diversos materiales 2D han emergido como prometedores para la próxima generación de dispositivos optoelectrónicos flexibles, debido a su potencial para superar las limitaciones de los semiconductores tradicionales.

Los materiales 2D, formados por una o pocas capas atómicas, tienen una estructura que otorga propiedades excepcionales (Yang *et al*., 2019), como alta resistencia mecánica, transparencia óptica y conductividad eléctrica, lo que los hace ideales para su uso en dispositivos avanzados como celdas solares, supercondensadores y sensores flexibles (Dong *et al*., 2019). Además, la posibilidad de manipular sus propiedades a través de métodos de procesado basados en soluciones, como la impresión por inyección de tinta y el recubrimiento por rotación, facilita su integración en la fabricación de dispositivos electrónicos (Nevalaita y Koskinen, 2018).

El desarrollo de materiales bidimensionales no solo ha impactado campos como la electrónica y la optoelectrónica, sino que ha abierto nuevas oportunidades en la creación de sensores flexibles y dispositivos portátiles. La combinación de flexibilidad, resistencia y propiedades electrónicas excepcionales de estos materiales permite superar las limitaciones de los semiconductores tradicionales, ofreciendo soluciones innovadoras para el monitoreo y cuidado de pacientes en entornos críticos (Wangyang *et al*., 2016). Entre estos materiales, el PbI_2 ha emergido como un semiconductor de banda ancha anisotrópico con aplicaciones tecnológicas avanzadas, como detectores de radiación y dispositivos fotovoltaicos (Baibarac *et al*., 2015; Wangyang *et al*., 2016; Song *et al*., 2018).

Por otro lado, uno de los materiales poliméricos ampliamente difundidos en tecnologías verdes es el PVA (Aslam *et al*., 2018), conocido por su alta solubilidad en agua, bajo costo, respetuoso con el ambiente, y propiedades ópticas favorables, como la transparencia y la rigidez dieléctrica. El PVA es flexible, resistente y posee propiedades de barrera de oxígeno. Su capacidad para cristalizar se debe a los enlaces de hidrógeno entre sus cadenas, lo que permite mejorar sus propiedades mecánicas y ópticas. Cuando se introducen nanopartículas en la matriz polimérica, estas actúan como agentes nucleantes, mejorando la cristalización del PVA (Aslam *et al*., 2018). Cuenta con un alto índice de refracción, siendo muy útil en aplicaciones ópticas y fotónicas al reducir las pérdidas por reflexión en las interfaces, aumentando así la salida de luz. Estas propiedades hacen del PVA un importante candidato para dispositivos optoelectrónicos (Abdelaziz, 2011a; Ali, 2019a; El-Zahhar *et al*., 2022a).

Dado el creciente interés en materiales como el PbI_2 y el PVA para aplicaciones optoelectrónicas avanzadas, esta investigación tiene como objetivo la síntesis de películas compuestas de PVA dopadas con nanopartículas de PbI_2 en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 % en peso, utilizando un método de evaporación de solventes a baja temperatura. El enfoque se centra en evaluar cómo el dopaje de PbI_2 afecta las propiedades optoelectrónicas de las películas, explorando su potencial en dispositivos electrónicos flexibles y de alta eficiencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se requirieron de los siguientes reactivos: Nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$, fermont, pureza 99.8 %), yoduro de potasio (KI, Fermont, pureza 99.0 %), polivinilalcohol en polvo (PVA, Aldrich Chemical Company Inc., hidrolizado 100 %, peso molecular promedio de 86.000g/mol), glicerina de grado analítico (pureza 99.86 %). Todos los reactivos fueron utilizados tal como se compraron, esto es, sin más purificación.

Obtención de las películas

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de yoduro de plomo (PbI_2) mediante precipitación química. Para esto se preparó una solución acuosa con nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$) y yoduro de potasio (KI) a partes iguales en un vaso de precipitados con 40 ml de agua desionizada. La mezcla se agitó constantemente a temperatura ambiente, permitiendo que la reacción ocurriera durante dos horas. Las nanopartículas formadas se separaron por centrifugación a 6000 rpm (3220 × g) durante 10 minutos, se utilizó una centrifuga HERMLE Benchmark Z 206 A, posteriormente, las nanopartículas pasaron por un proceso de secado en un horno TERLAB a 70 °C, como se puede apreciar en la figura 1.

La matriz de polivinilalcohol (PVA) se sintetizó disolviendo 1.5 g de PVA en 50 mL de agua desionizada a 60 °C, con agitación constante hasta la disolución completa. Posteriormente, se dejó enfriar la solución de PVA a temperatura

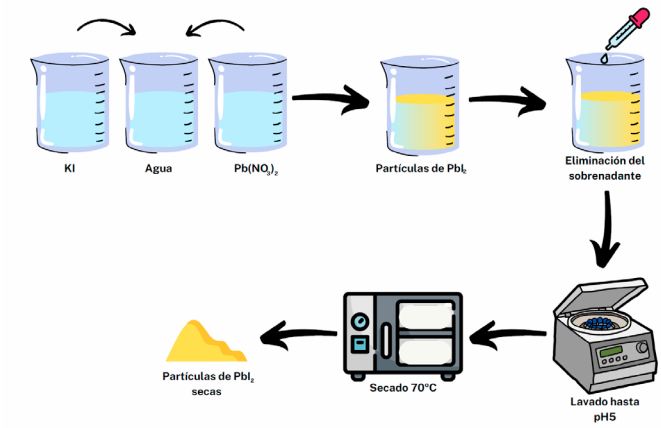


Figura 1. Esquema de síntesis de las partículas de yoduro de plomo (PbI_2).
Figure 1. Synthesis scheme of lead iodide (PbI_2) particles.

ambiente para verterla en los moldes y pasar al proceso de secado a 70 ºC, en un horno de secado TERLAB, por 24 horas. Se prepararon películas de compuestos de PVA con diferentes concentraciones de PbI_2 (0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 2.0 %), como se puede apreciar en la figura 2. Este proceso es capaz de producir nanopartículas de alta pureza con una estructura cristalina hexagonal, típicamente con diámetros de entre 50 y 200 nm.

Las nanopartículas y las películas compuestas se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) utilizando un difractómetro BRUKER D8 Advance Eco, con radiación Cu-Kα de 1.5406 Å, se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo Frontier con el aditamento de ATR, para medir espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), los espectros fueron obtenidos en la ventana espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, la morfología se obtuvo mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando un equipo JEOL, Modelo JSM-5410 y el ancho de banda se determinó mediante espectroscopía UV-Vis empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25, los espectros fueron obtenidos en un intervalo espectral en el rango de longitud de onda

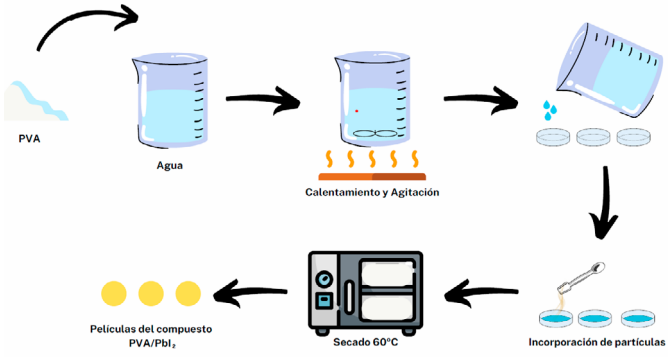


Figura 2. Esquema de la síntesis de las partículas PbI_2 y del compuesto PVA/PbI_2.
Figure 2. Schematic diagram of the synthesis of PbI_2 particles and PVA/PbI_2 composite.

de 200 a 900 nm. Finalmente, las propiedades eléctricas se obtuvieron mediante las curvas de corriente contra voltaje (I-V) utilizando el equipo Keithley 2400.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización estructural

La caracterización estructural de las partículas de PbI_2, mostrada en la figura 3, revela que las partículas presentan un alto grado de cristalinidad, como se confirma por el difractograma obtenido (Ismail *et al*., 2016). Los patrones de difracción de rayos X se compararon con la carta cristalográfica del politipo hexagonal 2H del PbI_2, lo cual permitió identificar su estructura cristalina. Los picos característicos de este politipo fueron observados en los ángulos de difracción 2θ correspondientes a los planos principales (001), (101) y (102), coincidiendo con los datos de la base de datos JCPDS # 01-073-1751 (El-Mongy *et al*., 2020).

El tamaño promedio de los cristalitos se calculó utilizando la ecuación de Scherrer, obteniéndose un valor de 52.8 nm. Este valor sugiere una buena cristalinidad de las nanopartículas, ya que un tamaño de cristalito más peque-

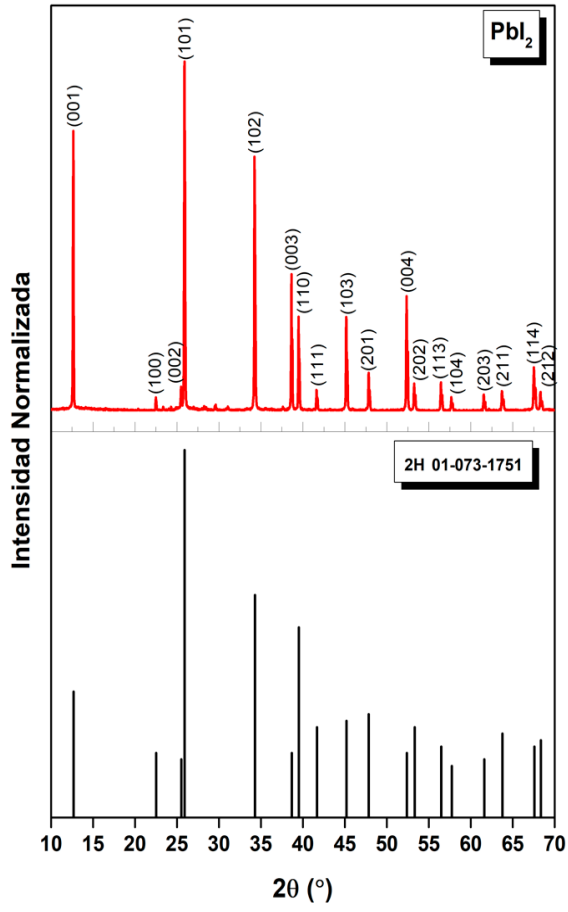


Figura 3. Patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas de yoduro de plomo y carta cristalográfica JCPDS # 01-073-1751, correspondiente al politipo hexagonal de PbI_2 2H.
Figure 3. X-ray diffraction pattern of lead iodide nanoparticles. JCPDS crystallographic card # 01-073-1751, corresponding to PbI_2 2H hexagonal polytype.

ño indica bordes menos definidos que pueden afectar la movilidad de las cargas. Al tener un dominio cristalino bien estructurado, se optimiza la movilidad de las cargas en aplicaciones optoelectrónicas (Lim *et al*., 2020). Comparado el tamaño de cristalito de las nanoparticulas de PbI_2 con otros semiconductores, esta cristalinidad es clave para obtener un alto rendimiento del material y poder ser aplicado en dispositivos avanzados (Manh *et al*., 2023).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El análisis morfológico de las nanopartículas de PbI_2 sintetizadas se realizó utilizando MEB. Las imágenes obtenidas se pueden observar en la figura 4, mostrando que las partículas presentan una morfología altamente definida, con una geometría predominantemente hexagonal, característica de la estructura cristalina del PbI_2. La distribución de tamaños de partículas reveló un rango comprendido entre 1 y 2 µm de diámetro, lo que corresponde a la formación de cristales laminares bien desarrollados, coherentes con la naturaleza anisotrópica del material.

Aumentos mayores permitieron observar con mayor detalle la disposición en capas de las partículas, típica de los materiales bidimensionales como el PbI_2. Estas capas están unidas por interacciones de Van der Waals, lo que facilita la exfoliación y contribuye a la formación de partículas con superficies relativamente planas (Wangyang *et al*., 2016). La uniformidad en el tamaño y la forma de las partículas sintetizadas sugiere que el proceso de precipitación química empleado es eficaz para controlar la morfología de las nanopartículas, lo cual es esencial para aplicaciones en dispositivos optoelectrónicos, donde la regularidad y homogeneidad del material influyen directamente en el rendimiento.

Además, las micrografías revelaron la ausencia de agregados significativos, lo que indica una buena dispersión de las partículas en la matriz polimérica. Este comportamiento es crucial para garantizar la integridad estructural y las propiedades ópticas y eléctricas de las películas compuestas de PVA/PbI_2 (El-Zahhar *et al*., 2022b). Las partículas individuales mantienen su forma hexagonal a pesar de la incorporación en la matriz, lo que demuestra que el proceso de síntesis y posterior integración en la matriz no afecta de manera adversa su morfología (Almohammedi *et al*., 2020).

El análisis morfológico detallado también muestra la influencia del tamaño de las partículas en las propiedades ópticas del material. A medida que aumenta la concentración de partículas en la matriz se observa una mayor dispersión de la luz, lo que contribuye a la reducción de la transmitancia en los ensayos UV-Vis. Este comportamiento está directamente relacionado con la morfología laminar y el tamaño de las partículas, que actúan como centros dispersores eficientes.

Las imágenes MEB confirman que las nanopartículas de PbI_2, sintetizadas mediante precipitación química, presentan una morfología bien definida, con características que potencian sus propiedades funcionales en aplicaciones tecnológicas avanzadas. La alta uniformidad en la forma y tamaño de las partículas es un indicativo de la robustez del método de síntesis utilizado, garantizando materiales de calidad para su uso en dispositivos de detección y optoelectrónica.

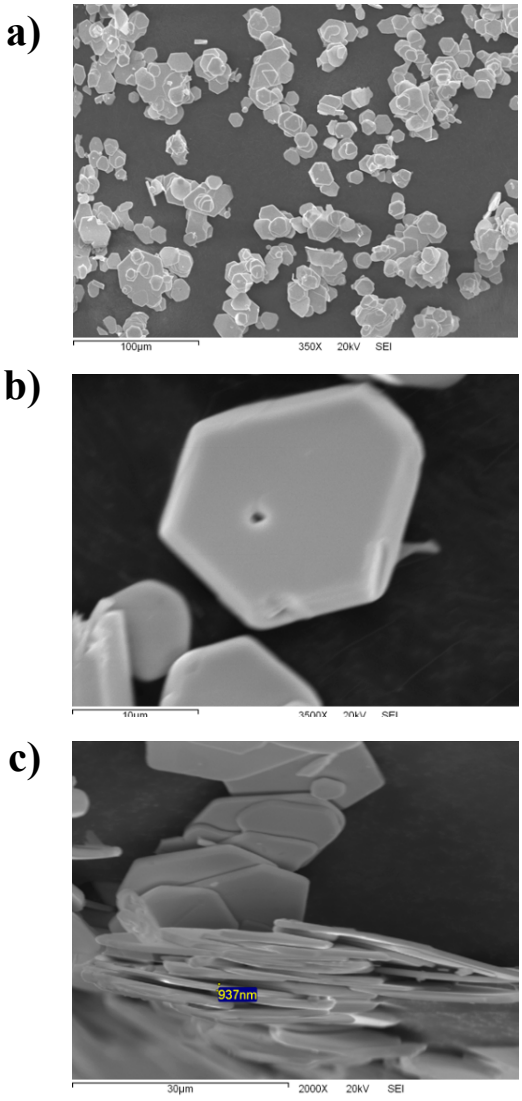


Figura 4. Imágenes MEB de las partículas de yoduro de plomo. a) 350X, b) 3500X y c) sección transversal 2000X.
Figure 4. SEM images of lead iodide particles. a) 350X, b) 3500X and c) cross section 2000X.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR fue empleada para estudiar las interacciones químicas entre las nanopartículas de yoduro de plomo (PbI_2) y la matriz polimérica de polivinilalcohol (PVA). Los espectros obtenidos presentes en la figura 5 revelaron las bandas características del PVA, con intensidades asociadas al estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) alrededor de los 3290 cm^{-1} y al estiramiento de los enlaces C-H a aproximadamente 2940 cm^{-1}, típicos de la estructura molecular del polímero (Ali, 2019b). Además, se observaron las bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los grupos C=O y C-O, reflejando la estructura química básica del PVA (Moustafa *et al*., 2021).

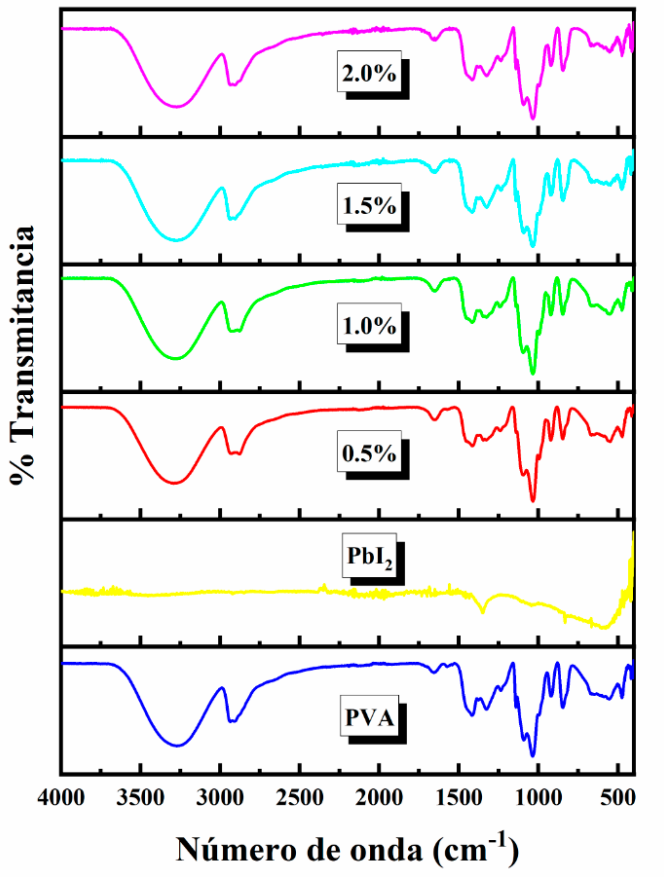


Figura 5. Espectro FTIR de las películas de PVA con diferentes porcentajes de partículas de PbI_2.
Figure 5. FTIR spectrum of PVA films with different percentages of PbI_2 particles.

La incorporación de las nanopartículas de PbI_2 a la matriz de PVA no produjo cambios significativos en la posición de las principales bandas de absorción del PVA, lo que sugiere que no se forman enlaces químicos directos entre las partículas y el polímero. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la intensidad de las bandas correspondientes al grupo O-H, lo que podría indicar interacciones entre los grupos funcionales del PVA y la superficie del PbI_2 (Malevu *et al*., 2016).

Este comportamiento es coherente con la naturaleza física de la interacción entre el PVA y las partículas de PbI_2, donde las partículas actúan como rellenos en la matriz sin alterar significativamente su estructura química (Abdelaziz, 2011b). La estabilidad de las bandas de absorción del PVA frente a la adición de PbI_2 confirma que el proceso de síntesis y la posterior formación del compuesto no generan nuevas fases químicas, resaltando las características del polímero.

El análisis FTIR también permitió evaluar la uniformidad de la dispersión de las nanopartículas dentro de la matriz polimérica. La ausencia de bandas adicionales o de desplazamientos importantes en las frecuencias de los grupos funcionales indica una buena compatibilidad entre el PVA y el PbI_2, lo que sugiere que las partículas están adecuadamente distribuidas y no interfieren en las propiedades intrínsecas del polímero (Malevu *et al*., 2016). Además, esta compatibilidad química es fundamental para mantener las propiedades mecánicas y ópticas del compuesto, ya que una dispersión uniforme garantiza que las partículas de PbI_2 no formen aglomerados que puedan afectar negativamente el rendimiento del material.

Los resultados de FTIR demuestran que la incorporación de nanopartículas de PbI_2 en la matriz de PVA no altera significativamente la estructura química del polímero. Las interacciones entre el PbI_2 y el PVA son de carácter físico, lo que favorece la integridad de las propiedades del compuesto. Este comportamiento sugiere que el compuesto resultante es adecuado para aplicaciones en las que se requiere la combinación de las propiedades del PVA y del PbI_2, como en dispositivos optoelectrónicos o de detección, donde es crucial mantener tanto la funcionalidad óptica como la estabilidad mecánica del material (Liu *et al*., 2022).

Espectroscopía UV-Vis

Como se puede observar en la figura 6 de transmitancia contra longitud de onda, la película de PVA presenta un 75 % de transmitancia en el rango de 900 a 550 nm. Por otro lado, las películas del compuesto con diferentes porcentajes de PbI_2, muestran una disminución en el porcentaje de transmitancia a medida que se aumenta la cantidad de partículas de PbI_2, esta disminución de la transmitancia se debe a un efecto de adsorción y dispersión de los fotones al incidir sobre las partículas de PbI_2 (Khairy *et al*., 2020). Además, se puede observar que el porcentaje de transmitancia se aproxima a cero a longitudes de onda de 240 nm.

Posteriormente, con los datos de UV-Vis se determinó la brecha de energía óptica de las películas de PVA puro y PVA con distintas concentraciones de nanopartículas de PbI_2 fabricadas. Para la obtención de dichas brechas de energía es necesario hacer uso del método gráfico de Tauc para transiciones directas e indirectas (Skoog *et al*., 2008; El-Zahhar *et al*., 2022b). La brecha de energía óptica indirecta para la

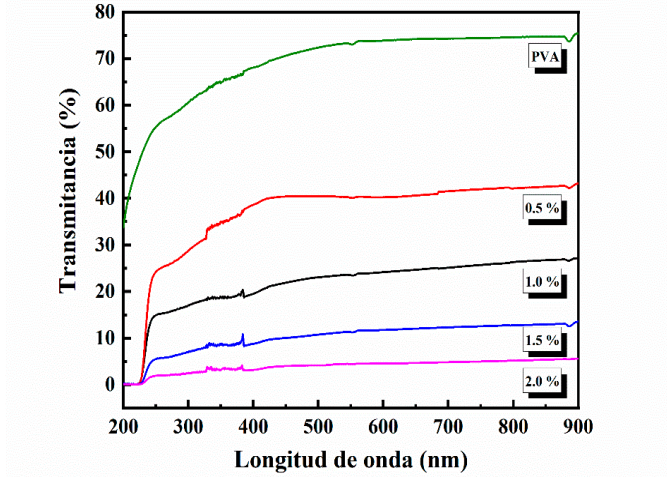


Figura 6. Espectros UV-Vis en transmitancia de las películas de PVA con diferentes concentraciones de partículas de PbI_2.
Figure 6. UV-Vis transmittance spectra of PVA films with different concentrations of PbI_2 particles.

matriz polimérica de PVA fue de 4.654 eV, también se puede observar que la brecha de energía para el compuesto PVA/PbI_2 es afectada por la presencia de las partículas de yoduro de plomo, mostrando una disminución en la brecha de energía óptica directa e indirecta con el aumento de la cantidad de partículas de yoduro de plomo en la matriz polimérica de PVA, como se puede observar en la figura 7. Esta disminución de la brecha de energía se debe a la inducción de nuevos niveles en la banda prohibida, lo que conduce a simplificar el tránsito de electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción (Khairy *et al*., 2020). En otras palabras, la disminución de la brecha de energía representa el grado de desorden de la matriz polimérica de PVA (Khairy *et al*., 2020), debido a la adición de las partículas de yoduro de plomo, estas inducen un orden en la matriz de PVA provocando zonas cristalinas en el polímero, ayudando al cambio de la brecha de energía.

Propiedades eléctricas

El comportamiento eléctrico de las películas, tanto de PVA como del compuesto de PVA/PbI_2 con sus diferentes adiciones de partículas de yoduro de plomo se puede observar en la figura 8. La medición se realizó por medio del método de dos puntas. Donde se puede observar que la película de PVA no presenta alguna respuesta eléctrica obteniendo una resistencia de $4.318 \times 10^7\ \Omega$, sin embargo, al adicionar las partículas de PbI_2 se propicia una diminución en la resistencia en el orden de $\sim 10^6\ \Omega$. Lo cual se refleja en incrementos en la corriente en respuesta a las diferentes adiciones de partículas de PbI_2 (Sabry, Mohammed and Yahia, 2019). Además, los resultados muestran que se tiene una buena conexión óhmica debido al comportamiento lineal de las mediciones (El-Zahhar *et al*., 2022b). Con lo anterior, se puede inferir que debido a la modulación de corriente debida a la incorporación de las partículas en el PVA el material compuesto es prometedor para aplicaciones en electrónica flexible.

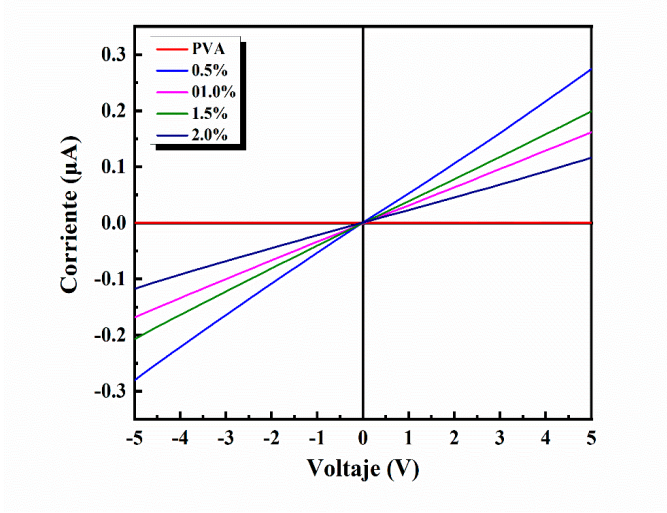


Figura 8. Curvas I-V del compuesto de PVA/PbI_2.
Figure 8. I-V curves of PVA/PbI_2 composite.

CONCLUSIONES

En conclusión, se logró con éxito la síntesis de PbI_2 mediante el método de precipitación química, confirmada por la caracterización mediante XRD, que mostró la presencia de una estructura cristalina hexagonal correspondiente al politipo 2H. Las imágenes SEM revelan la formación de partículas con morfología hexagonal y tamaño uniforme. Se obtuvieron películas compuestas de PVA/PbI_2 con diferentes concentraciones de yoduro de plomo, utilizando un método de evaporación de solventes a baja temperatura. El análisis UV-Vis demostró que el espectro de transmisión de las películas se ve afectado por el incremento en la concentración de PbI_2, mostrando que el comportamiento de la transmitancia no es lineal, lo que sugiere que el coeficiente de absorción y la brecha de energía dependen del acomodo y la interacción entre las partículas de PbI_2 dentro de la matriz de PVA.

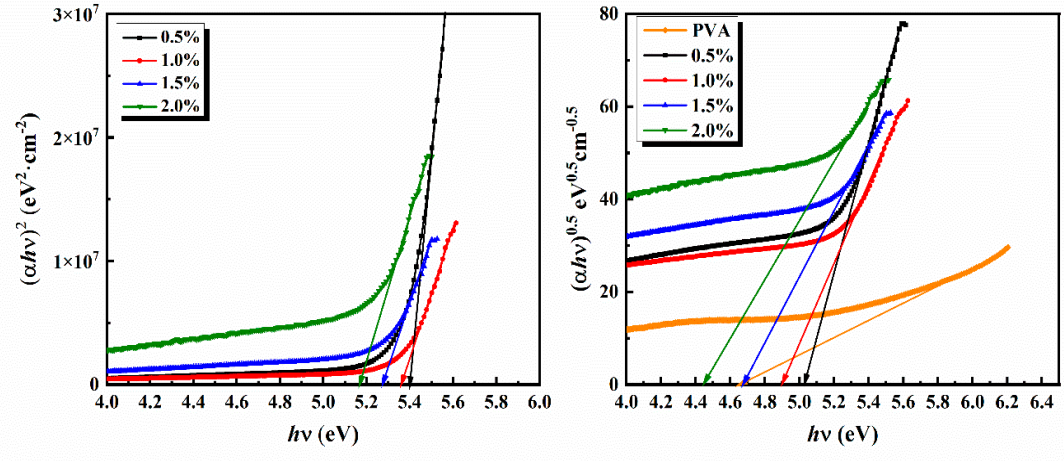


Figura 7. Relación entre $(\alpha h\upsilon)^2$, $(\alpha h\upsilon)^{0.5}$ y la energía de los fotones ($h\upsilon$).
Figure 7. Relationship between $(\alpha h\upsilon)^2$, $(\alpha h\upsilon)^{0.5}$ and the photon energy ($h\upsilon$).

Mediante FTIR, se verificó que la adición de las partículas no altera significativamente las bandas características del PVA, lo que indica la ausencia de enlaces químicos fuertes entre las partículas de PbI_2 y la matriz polimérica. Las interacciones entre ambos componentes parecen estar mediadas por enlaces débiles, específicamente por la modificación de los enlaces O-H del PVA.

En conjunto, este estudio establece una base sólida para futuras investigaciones en el desarrollo de materiales híbridos basados en PVA y PbI_2, con aplicaciones potenciales en sensores, dispositivos fotovoltaicos y sistemas optoelectrónicos. Los resultados presentados no solo confirman la viabilidad de este compuesto para su aplicación en diversas industrias, sino que también destacan la importancia de explorar nuevas estrategias de síntesis que promuevan la sostenibilidad y la eficiencia en la producción de materiales de alto rendimiento.

CONFLICTO DE INTERÉS

Todos los autores revisaron las versiones previas del manuscrito, lo leyeron y aprobaron su versión final. Asimismo, declaran no tener ningún conflicto de intereses.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por los proyectos Universidad de Sonora USO316008247 y USO316007563 y la Beca de Estancia de Investigación 2024-25, así como por el CONAHCyT Ciencia de Frontera CF-2023-I-920 y Estancias Sabáticas I1200/311/2023.

REFERENCIAS

Abdelaziz, M. (2011) Cerium (III) doping effects on optical and thermal properties of PVA films. *Physica B: Condensed Matter*, 406(6–7), 1300–1307. Available online: https://doi.org/10.1016/j.physb.2011.01.021.

Ali, H. (2019) The influence of yttrium-ions on the optical and electrical behavior of pva polymeric films. *Materials Research Express*, 6(4). Available online: https://doi.org/10.1088/2053-1591/aafbee.

Almohammedi, A., Khan, M.T., Benghanem, M., Aboud, S.W., Shkir, M. & AlFaify, S. (2020) Elucidating the impact of PbI2 on photophysical and electrical properties of poly(3-hexythiophene). *Materials Science in Semiconductor Processing*, 120. Available online: https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105272.

Aslam, M., Kalyar, M.A. & Raza, Z.A. (2018) Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polymer Engineering and Science*, 58(12), 2119–2132. Available online: https://doi.org/10.1002/pen.24855.

Baibarac, M., Smaranda, I., Scocioreanu, M., Mitran, R.A., Enculescu, M., Galatanu, M. & Baltog, I. (2015) Exciton-phonon interaction in PbI2 revealed by Raman and photoluminescence studies using excitation light overlapping the fundamental absorption edge. *Materials Research Bulletin*, 70, 762–772. Available online: https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.06.012.

Dong, Z., Xu, H., Liang, F., Luo, C., Wang, C., Cao, Z.Y., Chen, X.J., Zhang, J. & Wu, X. (2019) Raman characterization on two-dimensional materials-based thermoelectricity. *Molecules*, 24(1). Available online: https://doi.org/10.3390/molecules24010088.

El-Mongy, S.A., Mohammed, M.I. & Yahia, I.S. (2020) Preparation and spectroscopic studies of PbI2-doped poly(methyl methacrylate) nanocomposites films: Dielectric and optical limiting approach. *Optical Materials*, 100(December 2019), 109626. Available online: https://doi.org/10.1016/j.optmat.2019.109626.

El-Zahhar, A.A., Ashraf, I.M., Idris, A.M. & Zkria, A. (2022) Pronounced effect of PbI2 nanoparticles doping on optoelectronic properties of PVA films for photo-electronic applications. *Physica B: Condensed Matter*, 630(November 2021), 413604. Available online: https://doi.org/10.1016/j.physb.2021.413604.

Ismail, R.A., Mousa, A.M., Khashan, K.S., Mohsin, M.H. & Hamid, M.K. (2016) Synthesis of PbI2 nanoparticles by laser ablation in methanol. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 27(10), 10696–10700. Available online: https://doi.org/10.1007/s10854-016-5169-y.

Khairy, Y., Yahia, I.S. & Elhosiny Ali, H. (2020) Facile synthesis, structure analysis and optical performance of manganese oxide-doped PVA nanocomposite for optoelectronic and optical cut-off laser devices. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(10), 8072–8085. Available online: https://doi.org/10.1007/s10854-020-03348-0.

Li, M., Wang, S., Wang, Q., Ren, F. & Wang, Y. (2021) Preparation, microstructure and tensile properties of two dimensional MXene reinforced copper matrix composites. *Materials Science and Engineering A*, 803(December 2020), 140699. Available online: https://doi.org/10.1016/j.msea.2020.140699.

Lim, D.J., Marks, N.A. & Rowles, M.R. (2020) Universal Scherrer equation for graphene fragments. *Carbon*, 162, 475–480. Available online: https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.02.064.

Lima, A.F.S., Silva, E.B. de F., Guimarães, M. das N., Comassetto, I. & Santos, R.M. dos (2022) Dilemas éticos durante la pandemia del covid-19. *Revista Bioética*, 30(1), 19–26. Available online: https://doi.org/10.1590/1983-80422022301502es.

Liu, B., Zhang, J. & Guo, H. (2022) Research Progress of Polyvinyl Alcohol Water-Resistant Film Materials. *Membranes*. MDPI. Available online: https://doi.org/10.3390/membranes12030347.

Malevu, T.D., Ocaya, R.O. & Tshabalala, K.G. (2016) Phase transformations of high-purity PbI2 nanoparticles synthesized from lead-acid accumulator anodes. *Physica B: Condensed Matter*, 496, 69–73. Available online: https://doi.org/10.1016/j.physb.2016.05.027.

Manh, D.H., Ngoc Nha, T.T., Hong Phong, L.T., Nam, P.H., Thanh, T.D. & Phong, P.T. (2023) Determination of the crystalline size of hexagonal La1−xSrxMnO3 (x = 0.3) nanoparticles from X-ray diffraction - a comparative study. *RSC Advances*, 13(36), 25007–25017. Available online: https://doi.org/10.1039/d3ra04018f.

Mansur, H.S., Sadahira, C.M., Souza, A.N. & Mansur, A.A.P. (2008) FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C*, 28(4), 539–548. Available online: https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088.

Martínez Márquez, M.A. (2021) Realidades y retos en el uso de las TIC en educación, por la emergencia sanitaria provocada por el COVID-19. *Revista de Investigación En Tecnologías de La Información*, 9(19), 73–88. Available online: https://doi.org/10.36825/riti.09.19.006.

Nevalaita, J. & Koskinen, P. (2018) Atlas for the properties of elemental two-dimensional metals. *Physical Review B*, 97(3), 1–11. Available online: https://doi.org/10.1103/PhysRevB.97.035411.

Sabry, N., Mohammed, M.I. & Yahia, I.S. (2019) Optical analysis, optical limiting and electrical properties of novel PbI2/PVA polymeric nanocomposite films for electronic optoelectronic applications. *Materials Research Express*, 6(11). Available online: https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab4c24.

Skoog, D.A., Holler, J.F. & Crouch, S.R. (2008) *Principios de análsis instrumental CENGAGE Learning*.

Song, H.B., Karakurt, I., Wei, M., Liu, N., Chu, Y., Zhong, J. & Lin, L. (2018) Lead iodide nanosheets for piezoelectric energy conversion and strain sensing. *Nano Energy*, 49(April), 7–13. Available online: https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2018.04.029.

Wangyang, P., Sun, H., Zhu, X., Yang, D. & Gao, X. (2016) Mechanical exfoliation and Raman spectra of ultrathin PbI2 single crystal. *Materials Letters*, 168, 68–71. Available online: https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.01.034.

Yang, Y., Cao, Z., He, P., Shi, L., Ding, G., Wang, R. & Sun, J. (2019) Ti3C2Tx MXene-graphene composite films for wearable strain sensors featured with high sensitivity and large range of linear response. *Nano Energy*, 66(July), 104134. Available online: https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2019.104134.

Yuan, W., Qu, X., Lu, Y., Zhao, W., Ren, Y., Wang, Q., Wang, W. & Dong, X. (2021) MXene-composited highly stretchable, sensitive and durable hydrogel for flexible strain sensors. *Chinese Chemical Letters* [Preprint]. Available online: https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.12.003.

Yuan, W., Yang, J., Yin, F., Li, Y. & Yuan, Y. (2020) Flexible and stretchable MXene/Polyurethane fabrics with delicate wrinkle structure design for effective electromagnetic interference shielding at a dynamic stretching process. *Composites Communications*, 19(February), 90–98. Available online: https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.03.003.

Zheng, Y., Yin, R., Zhao, Y., Liu, H., Zhang, D., Shi, X., Zhang, B., Liu, C. & Shen, C. (2020) Conductive MXene/cotton fabric based pressure sensor with both high sensitivity and wide sensing range for human motion detection and E-skin. *Chemical Engineering Journal*, (August), 127720. Available online: https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127720.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Extracto polifenólico de hojas de mango (*Mangifera indica* L.): Microencapsulación, caracterización fisicoquímica y actividad antifúngica *in vivo*

Polyphenolic extract of mango leaves (*Mangifera indica* L.): Microencapsulation, physicochemical characterization and *in vivo* antifungal activity

Jesús Emmanuel Domínguez-Ruvalcaba[1], Montserrat Calderón-Santoyo[1], Katia Nayely González-Gutiérrez[1] y Juan Arturo Ragazzo-Sánchez[1]

[1] Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico 2595, Tepic, Nayarit, C.P. 63175, México.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue proteger un extracto de hojas de mango rico en polifenoles mediante la microencapsulación por secado por aspersión para conservar su actividad antifúngica *in vivo*. Se preparó una disolución polimérica (DP) de goma arábiga y alginato de sodio; adicionada con extracto de hoja de mango. Se evaluó la temperatura de transición vítrea de la DP y se procesó en un secador por aspersión. A las cápsulas se le evaluaron parámetros fisicoquímicos, fotoestabilidad, termoestabilidad, FTIR y actividad antifúngica *in vivo* frente a *Penicillium digitatum* en naranjas y *Botrytis cinerea* en arándanos. Los parámetros fisicoquímicos de los encapsulados fueron adecuados para estabilizar un extracto orgánico obtenido mediante secado por aspersión. El análisis FTIR evidenció la presencia del extracto en las cápsulas y la ausencia de interacciones fuertes del extracto con los biopolímeros. El extracto microencapsulado mostró alta estabilidad a la temperatura y a la radiación UV. Las cápsulas demostraron buena actividad antifúngica reduciendo la severidad de *P. digitatum* en un 70 % y la incidencia de *B. cinerea* en un 100 %. Las cápsulas presentaron características deseables que les permite proteger los polifenoles, adicionalmente, al ser altamente solubles liberan los compuestos sobre el epicarpio de los frutos, lo que representa una alternativa natural para la conservación de frutos.

Palabras clave: Microencapsulados, polifenoles, fotoestabilidad, termoestabilidad, fitopatógeno.

ABSTRACT

This study aimed to protect a polyphenol-rich mango leaf extract by spray-drying microencapsulation to preserve its *in vivo* antifungal activity. A polymeric solution (PS) of gum arabic and sodium alginate was prepared; added with mango leaf extract. The glass transition temperature of the PS was evaluated and it was processed in a spray dryer. The capsules were evaluated for physicochemical parameters, photostability, thermostability, FTIR, and *in vivo* antifungal activity against *Penicillium digitatum* in oranges and *Botrytis cinerea* in blueberries. The physicochemical parameters of the encapsulates were adequated to stabilize an organic extract obtained by spraydrying. The FTIR analysis showed the presence of the extract in the capsules and the absence of strong interactions of the extract with the biopolymers. The microencapsulated extract showed high stability to temperature and UV radiation. The capsules demonstrated good antifungal activity, reducing the severity of *P. digitatum* by 70 % and the incidence of *B. cinerea* by 100 %. The capsules presented desirable characteristics that allow them to protect the polyphenols. Additionally, being highly soluble, they release the compounds on the fruit epicarp, which represents a natural alternative for the conservation of fruits.

Keywords: Microencapsulates, polyphenols, photostability, thermostability, phytopathogen.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios presentes en las plantas, frutas, hortalizas, raíces y cereales (Klepacka *et al*., 2011). Los compuestos fenólicos perteneces a los compuestos de alto valor biológico (CAVB) que incluyen enzimas, microorganismos y metabolitos secundarios con actividad biológica benéfica para los seres vivos (Ramos-Hernández *et al*., 2018). Se ha reportado que las hojas de mango son una fuente importante de compuestos fenólicos tales como benzofenonas, flavonoides, terpenoides y xantonas (Guamán-Balcázar *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2021). Además, se han atribuido a estos compuestos diversas actividades biológicas, tales como, antioxidante, antimicrobiana y antifúngica (Albuquerque *et al*., 2021). Sin embargo, estas propiedades pueden perderse debido a factores medioambientales, como exposición a la luz, la humedad y oxígeno (Ballesteros *et al*., 2017). Por lo que se buscan alternativas de protección, en este sentido, la encapsulación provee una barrera física entre el medio circundante y los compuestos encapsulados brindándoles estabilidad (Ribeiro *et al*., 2019). Una de las técnicas de encapsulación más utilizadas en la industria es el secado por aspersión debido a que es un proceso continuo, económico y de fácil escalabilidad (Yazdi *et al*., 2021).

El secado por aspersión requiere materiales de pared para encapsular el compuesto de interés y obtener un producto en polvo (Ziaee *et al*., 2019). Por lo que debe haber compatibilidad del material de pared con el compuesto de interés, para asegurar una encapsulación eficiente (Nedović

*Author for correspondence: Juan Arturo Ragazzo-Sanchez
e-mail: jragazzo@tepic.tecnm.mx
Recibido: 11 de septiembre de 2024
Aceptado: 21 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2439

et al., 2013). Los materiales de pared deben ser económicos, no reaccionan con el núcleo y se identifican como GRAS, entre los más utilizados debido a su alta solubilidad, baja viscosidad, gelificación y formación de películas son las proteínas y polisacáridos (Safeer-Abbas *et al*., 2023); más específicamente la maltodextrina, alginato, almidones y gomas (Macías-Cortés *et al*., 2020; Díaz-Montes, 2023). Se ha reportado que la mezcla de dos o más materiales de pared incrementa la eficiencia de encapsulación, así como la estabilidad térmica conservando sus propiedades biológicas (Tao *et al*., 2019; Dierings de Souza *et al*., 2021). Por estas razones el objetivo de la investigación fue obtener y caracterizar las cápsulas de extracto de hojas de mango, obtenidas por secado por aspersión con alginato de sodio y goma arábiga para su aplicación en frutos de interés comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Encapsulación del extracto mediante secado por aspersión

Se preparó una solución utilizando la metodología propuesta por Calderón-Santoyo *et al*. (2022) con algunas modificaciones. Una solución de 250 mL (p/v) conformada por alginato de sodio 0.03 % el cual se disolvió en agua destilada por agitación magnética con una placa Fisher Scientific a 350 rpm durante 24 h a 25 ± 1 °C. Pasadas las 24 h, a la solución de alginato de sodio se le añadió goma arábiga (7.5 % m/v) y 3 % (m/v) del extracto óptimo de las hojas de mango, la cual se homogenizó y después se encapsuló usando un equipo de escala laboratorio de secado por aspersión mini Spray Dryer (Modelo B-290, Büchi, Flawil, Suiza), con una boquilla de alimentación de 7 mm de diámetro bajo caudal constante y presión de aire (35 m^3/h y 0.7 MPa, respectivamente), se mantuvo bajo una agitación constante a temperatura ambiente y 350 rpm, se alimentó por una bomba peristáltica a un caudal de 5 mL/min, la temperatura del aire de entrada y de salida fue de 105 y 63 °C, respectivamente.

Caracterización fisicoquímica

Determinación de la higroscopicidad

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Arepally *et al*. (2020). Se colocó 1 g de muestra en cajas Petri de 9 cm de diámetro (previamente a peso constante obtenido una vez que la caja de Petri perdió por completo su humedad a 105 ºC y la diferencia de peso entre dos mediciones sucesivas no excedió los 0.0003 g), se colocaron en un desecador a 21 °C y 76 % de humedad relativa (HR) (solución de 36 g NaCl en 100 g de agua). Se registró el incremento del peso después de 7 días, la higroscopicidad fue calculada de acuerdo a la ecuación 1.

$$\text{Higroscopicidad (g agua/g de muestra)} = ((M_f - M_i)/M_i)*100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde Mf es el peso de las cajas con muestra después de 7 días y Mi el peso de las cajas al inicio de la prueba.

Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Calderón-Santoyo *et al*. (2022). Se utilizó un difractómetro láser Mastersizer (Modelo 3000, Malvern instruments, Malvern, Reino Unido). Las mediciones se realizaron a 25 °C y se colocaron 3 g de polvo manualmente en la tolva. Las condiciones de operación fueron: suministro de aire y el sistema de extracción de vacío conectados al 30 % de vibración, abertura de salida de 1 mm y aire comprimido a 2 bar de presión. Luego, la muestra pasó al Mastersizer con un valor oscurecimiento del 15 % y un índice de refracción de 1.432.

Determinación de la solubilidad

Se utilizó la metodología propuesta por Jiménez-Sánchez *et al*. (2017), brevemente, se colocó 1 g de polvo en 100 mL de agua destilada, se agitó manualmente hasta que se solubilizó toda la muestra, y se centrifugaron 15 mL (Modelo X4R PRO-MD, Thermo Fisher Scientific Inc., Osterode am, Harz, Alemania) a 5260 rpm durante 5 min. Se tomó una muestra de 2 mL del sobrenadante y se colocó en cajas Petri (previamente a peso constante obtenido una vez que la caja de Petri perdió por completo su humedad a 105 ºC y la diferencia de peso entre dos mediciones sucesivas no excedió los 0.0003 g). Finalmente, se secó en una estufa a 105 °C por 5 h. La solubilidad (%) fue calculada por diferencia de peso mediante la ecuación 2.

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left(\frac{Mf}{Mo}\right) * 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde: Mf: masa final y Mo= masa inicial.

Determinación de la densidad aparente

La densidad aparente se realizó mediante la metodología propuesta por Jiménez-Sánchez *et al*. (2020), 5 g de cápsulas se transfirieron a una probeta graduada de 50 mL, después se movió verticalmente 10 veces. La densidad aparente se calculó dividiendo la masa entre el volumen, y se expresó como g/mL.

Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Ruiz-Montañez *et al*. (2019). Se utilizó un método termogravimétrico con equipo (TGA 550, TA instrumentos, New Castle, USA). Se colocaron 5 mg de muestra en una charola de platino HT, la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min en un rango de 25 a 800 °C bajo una atmósfera de nitrógeno.

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación fue calculada mediante la metodología propuesta por Navarro-Flores *et al*. (2020), con algunas modificaciones. La eficiencia de encapsulación se determinó para la actividad antioxidante total. Para ello, a 200 mg de cápsulas se les añadió 2 mL de una solución

compuesta por metanol y agua (1/1). La muestra se agitó en un vórtex por 1 min y se sonicó en un baño de ultrasonido (Modelo CD4820, Kendal, Eaton Sacon, Reino Unido) a 42 kHz, por 20 min a 25 °C. Finalmente, la muestra se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. La actividad antioxidante se calculó utilizando una curva de calibración con $ABTS^{+}$, como estándar se utilizó Trolox y la absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro (Modelo Varían Cary 50 UV-VIS, Sídney, Australia). Para determinar los compuestos en la superficie de las cápsulas, 200 mg de las cápsulas se combinó con 2 mL de la solución de metanol/ agua y se agitó en un vórtex por 1 min. La muestra fue centrifugada a 4000 rpm por 5 min. La eficiencia se calculó con la ecuación 3.

$$EE\ (\%) = \frac{\text{Aa total-Aa superficie}}{\text{Aa total}} * 100 \qquad \text{Ec. (3)}$$

Donde: Aa total es la actividad antioxidante total y Aa superficie es la actividad antioxidante en la superficie.

Evaluación de la termoestabilidad del extracto crudo y encapsulado

Se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) con un analizador termogravimétrico (Modelo TGA 550, TA instrumentos, New Castle, USA). Se colocaron 5 mg de muestra en una charola de platino HT, la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min en un rango de 25 a 800 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La pérdida de peso con respecto a la temperatura se expresó de acuerdo con la curva termogravimétrica (TG) y la curva termogravimétrica derivada de primer orden (TGD) mediante el software TRIOS. Las transiciones térmicas fueron analizadas por calorimetría diferencial de barrido en un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Modelo DSC 250, TA Instruments, New Castle, USA). Para ello, 5 mg de muestra se sellaron herméticamente en una charola de aluminio, como referencia se usó una charola sin muestra. Las muestras se calentaron de 25 a 400 °C con una velocidad de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno con flujo de 50 mL/min, la calibración se realizó con un estándar de indio. Los datos temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (Tm) se analizaron en el software TRIOS (Calderón-Santoyo *et al*., 2022).

Evaluación de la fotoestabilidad del extracto crudo y encapsulado

Se utilizó una lámpara Osram Ultra-Vitalux 300 W que simuló la radiación UV-A. El procedimiento se realizó en una cámara oscura, la distancia entre la lámpara y la muestra fue de 41 cm. La muestra se mantuvo expuesta a la luz en tiempos de 0, 24, 48, 96, 120 y 148 h, esta metodología se utilizó para evaluar el extracto encapsulado (Ramos-Hernández *et al*., 2018). Al finalizar cada tiempo de exposición se evaluó la actividad antioxidante, para ello, a 200 mg de cápsulas se les añadió 2 mL de una disolución compuesta por metanol y agua (1/1). La muestra se agitó en un vórtex por 1 min y se sonicó en un baño de ultrasonido a 42 kHz, por 20 min a 25 °C. La muestra se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. La actividad antioxidante se calculó utilizando una curva de calibración con $ABTS^{+}$, como estándar se utilizó trolox y la absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro.

Evaluación de la actividad antifúngica *in vivo* de los encapsulados

Las frutas de interés comercial (naranja y arándanos), fueron lavadas y desinfectadas con 2 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 2 min. Se realizaron soluciones de cápsulas y extracto a las concentraciones mínimas inhibitorias y fueron asperjadas con estas soluciones. Las frutas se perforaron (3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad) con una aguja estéril. Los frutos se inocularon con 20 µL de suspensión de esporas de *Penicillium digitatum* (1×10^5 esporas/mL) y *Botrytis cinerea* (1×10^3 esporas/mL). Los frutos se almacenaron en una cámara de incubación por 7 días a 28 ± 3 °C y 80 % HR. Se utilizaron 15 frutos para cada tratamiento y se obtuvieron los datos de incidencia (Ecuación 4) y severidad (Ecuación 5) de los frutos (Ayón-Macías *et al*., 2023).

$$\text{Incidencia}\ (\%) = \left(\frac{\text{Número de frutos infectados}}{\text{Número total de frutos}}\right) * 100 \qquad \text{Ec. (4)}$$

$$\text{Severidad}\ (\%) = ((dC\text{-}dT)/dC) * 100 \qquad \text{Ec. (5)}$$

Donde: dC es el diámetro de la lesión producida en los frutos control y dT diámetro de la lesión producida en los frutos tratados.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Cada experimento se repitió tres veces con tres réplicas por tratamiento. Las variables de respuesta se evaluaron con un análisis de varianza de una vía. Para determinar las diferencias significativas entre tratamientos se aplicó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 % ($P < 0.05$). Los datos se procesaron con el programa MINITAB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la disolución polimérica por DSC

Con el fin de determinar la temperatura de entrada para el secado por aspersión de la disolución polimérica conformada por goma arábiga y alginato de sodio, con y sin extracto, se realizó un análisis por DSC. Es importante comentar que la miscibilidad de los componentes es un factor importante en la determinación de la T_g, ya que, si los polímeros no están integrados completamente en la disolución, el análisis de DSC mostraría el valor de T_g del compuesto mayoritario. La T_g de la disolución con y sin extracto fue de 112.5 ± 0.5 °C. Este comportamiento indica que no existen interacciones fuertes entre el extracto y los polímeros (Iñiguez-Moreno *et al*., 2021). En este estudio, en base a la T_g obtenida de la disolución polimérica, se decidió utilizar 105 °C como temperatura de entrada de aire al secado por aspersión. Lo

anterior de acuerdo a Islam *et al.* (2010), quienes comentan que la temperatura de secado por aspersión se define con una diferencia menor a 10 °C respecto de la T_g para evitar el cambio amorfo de los polímeros.

Caracterización de las cápsulas

Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) de las cápsulas con extracto fue de 0.275 ± 0.01. Este resultado es un indicativo de la estabilidad de las cápsulas, ya que existe una menor cantidad de agua disponible que pueda ser usada para la proliferación de microorganismos (Ferrari *et al*., 2013). Este resultado fue comparable al obtenido por Ferrari *et al*. (2013) quienes utilizaron individualmente goma arábiga y alginato de sodio para encapsular ácido ascórbico, obteniendo a_w de 0.34 y 0.26, respectivamente. Los valores de a_w bajos son atribuidos a la alta tasa de transferencia de energía del aire caliente del secado por aspersión, en función de la viscosidad de la solución polimérica, lo que determina la velocidad de evaporación del agua contenida en la disolución alimentada para convertirla en polvo (Islam *et al*., 2010). Al tener las cápsulas una a_w mayor a 0.4, el agua libre puede crear reacciones negativas en los compuestos encapsulados, en general son de tres tipos oxidación, hidrólisis y polimerización de las moléculas (Chiou y Langrish, 2007; Kuck *et al*., 2017).

Distribución de tamaño de partícula

El tamaño promedio de las partículas obtenidas por secado por aspersión fue de D [4,3] = 6.53 µm. Este diámetro indicó la estabilidad de las cápsulas, ya que, a medida que se reduce su tamaño se tiene una mayor superficie de contacto, lo que facilita la liberación del compuesto activo de la cápsula (Shimanovich *et al*., 2014). Este resultado es mejor a los obtenidos por Chew *et al*. (2018), quienes al emplear goma arábiga y caseína de sodio en una proporción de 4:1 a una temperatura de aire de entrada de 160 °C, obtuvieron partículas con diámetro promedio de D [4,3]= 25 µm. Esto puede deberse a que el uso de una mayor temperatura de aire de entrada facilitó la formación de partículas más grandes, causadas por la rápida evaporación del agua, ya que el vapor de agua puede quedar atrapado en la coraza de la cápsula, incrementado su tamaño (Chegini y Ghobadian, 2005; Tonon *et al*., 2011). De igual manera, el aumento de temperatura acelera la migración de los materiales que forman dicha coraza (Aghbashlo *et al*., 2013).

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es un parámetro importante, ya que además de evaluar la rentabilidad del proceso, evalúa la calidad de las cápsulas, debido a que refleja la cantidad de extracto en el núcleo (Karagozlu *et al*., 2021). Se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 80 % para las cápsulas compuestas de goma arábiga, alginato de sodio y extracto de hoja de mango. Este valor clasifica al proceso como de alta eficiencia de encapsulación, la cual se asocia con la combinación de los materiales de pared utilizados. La respuesta obtenida es comparable y superior a lo reportado por González *et al*. (2019), quienes encapsularon extracto de hojas de olivo con alginato de sodio y obtuvieron 60 % de eficiencia de encapsulación. De acuerdo con Al-Maqtari *et al*. (2021) la combinación de los materiales encapsulantes tiene un papel importante en la eficiencia de encapsulación, ya que, un sólo material de pared no presenta todas las propiedades necesarias para una encapsulación eficiente. La diferencia en la eficiencia de encapsulación se asocia fuertemente con la compatibilidad de los materiales encapsulantes utilizados, condiciones y el tipo de proceso, entre otras (Nedović *et al*., 2013).

Hidrosolubilidad de las cápsulas

La solubilidad en agua es uno de los factores más importantes en las propiedades de los encapsulados, puesto que, de esta propiedad dependen sus aplicaciones e incorporación en diversos sistemas (Tomsone *et al*., 2020). La solubilidad de las cápsulas con extracto de hoja de mango presentó un valor de 95 ± 2 %. La solubilidad presentada fue comparable con lo reportado por Navarro *et al*. (2020) quienes utilizaron diferentes proporciones de maltodextrina con otros polímeros (goma arábiga, proteína de soya, goma de semillas de cajanus, y pectina de cáscara de cacao). Estos autores reportan solubilidades entre 82.15 y 86.54 %. La solubilidad es un factor que afecta la liberación del material del núcleo en el medio líquido (Bhattachar *et al*., 2006). Además, los polisacáridos como la goma arábiga tienen fuerte afinidad a las moléculas de agua debido al exceso de grupos hidroxilo (Savjani *et al*., 2012). Las diferencias existentes para esta propiedad se pueden atribuir a la característica individual de cada material encapsulante. Stanisavljevi´c *et al*. (2018) mencionan que la goma arábiga se caracteriza por una alta solubilidad y una baja viscosidad la cual es apropiada para el proceso de secado por aspersión. Adicionalmente, Al-Maqtari *et al*. (2021) describe que la goma arábiga consiste en cadenas proteicas hidrofóbicas y polisacáridos hidrofílicos, lo que le confiere una alta solubilidad. Por su parte, el alginato de sodio es un copolímero binario lineal de residuos de ácido manurónico y gulurónico que es menos anfifílico que la goma arábiga (Li *et al*., 2021). Por lo anterior, la alta solubilidad de las cápsulas se puede atribuir a la alta concentración de goma arábiga en la formulación.

Densidad aparente

La densidad aparente es un factor importante para el manejo, transporte y envasado de polvos, es por esto que, una mayor densidad aparente, indica que el polvo es más deseable debido a la menor ocupación de volumen (Zhang *et al*., 2020). Las cápsulas con extracto de hoja de mango mostraron una densidad aparente de 0.32 ± 0.02 g/mL. Al aumentar el valor de la densidad aparente, Rodríguez-Ramírez *et al*. (2012), mencionan que las partículas no forman aglomerados, tienen un tamaño de partícula uniforme y las partículas son de menor tamaño, lo cual favorece el manejo y envasado del polvo. Este dato es superior a lo obtenido por George *et al*. (2021), quienes elaboraron cápsulas de goma arábiga con

una densidad aparente de 0.177 g/mL. La diferencia puede atribuirse a la viscosidad de la solución polimérica, ya que el incremento de viscosidad incrementa el tamaño de las partículas. Como consecuencia hay una mayor ocupación del volumen en las capsulas con extracto y la densidad aparente disminuye (Sarabandi *et al*., 2019).

Higroscopicidad

La higroscopicidad de las cápsulas fue de 1.15 g H_2O/100 g de muestra. La baja higroscopicidad confirma la alta solubilidad obtenida. Adicionalmente, mejora la estabilidad física, el transporte y almacenaje de los polvos (Fujimori *et al*., 2016). Los resultados obtenidos fueron mejores a los reportados por Karrar *et al*. (2021), quienes al utilizar aislado de proteína de suero y la combinación de goma arábiga con maltodextrina para encapsular el aceite de semilla de gurum, obtuvieron 6.95 y 8.76 g H_2O/100 g de muestra, respectivamente. Las diferencias en las higroscopicidades de los materiales se deben a la estructura química, su composición y la existencia de grupos funcionales (Juárez-Enríquez *et al*., 2017). De igual manera, los grupos hidroxilo de los polisacáridos pueden formar enlaces con el hidrógeno de las moléculas de agua, lo que incrementa esta propiedad (Chew *et al*., 2018; Tao *et al*., 2019).

Evaluación de la termoestabilidad del extracto encapsulado

Las cápsulas con y sin extracto mostraron una primer pérdida de masa de 8 y 8.91 %, respectivamente a temperaturas de 52-54 °C (Tabla 1). La segunda pérdida de masa se registró a la temperatura de descomposición de las cápsulas de 290.82 °C (con extracto) y 295.9 °C (vacías), con pérdidas de masa de 71.11 y 67.53 %, respectivamente. Estos porcentajes másicos, indican la presencia del extracto en las cápsulas correspondientes. En lo que respecta al extracto, la temperatura de descomposición fue de 233.59 °C. Al comparar con la temperatura de descomposición de las cápsulas con extracto (290.82 °C) se evidenció que existió una termo protección en la encapsulación sobre el extracto. Además, en base a la bibliografía se encontró la temperatura de máxima descomposición de los compuestos identificados: mangiferina de 275.3 °C (Taiwo *et al*., 2024), ácido clorogénico de 283 °C (Owusu-Ware *et al*., 2013), ácido hidroxobenzoico de 215.03 °C (Rzokee y Ahmad, 2014), ácido cafeico de 230.3 °C (Liudvinaviciute *et al*., 2019) y el ácido cumárico de 275 °C (Lonashiro *et al*., 2012). Lo que permitió asumir que la temperatura de descomposición del extracto (233.59 °C) ha sido correctamente determinada. Adicionalmente, al comparar la temperatura de descomposición de las cápsulas con extracto y la de los componentes presentes en el extracto, se puede confirmar el incremento de la temperatura de descomposición, lo que evidencia la termoprotección para los componentes encapsulados.

El análisis DSC mostró que las cápsulas con y sin extracto, presentaron temperaturas de transición vítrea de 129 ± 0.5 y 130 ± 0.3 °C, respectivamente (Tabla 2). Los valores de T_g fueron estadísticamente iguales, lo que indica que no existen interacciones entre el extracto y los polímeros (Iñiguez-Moreno *et al*., 2021). La temperatura de transición vítrea es aquella donde los materiales amorfos pasan a un estado gomoso, este se ve afectado por la estructura química y el peso molecular del material de pared utilizado (Karrar *et al*., 2021).

Tabla 2. Temperatura de transición vítrea de biopolímeros, cápsulas sin extracto y extracto encapsulado.
Table 2. Glass transition temperature of biopolymers, capsules without extract, and encapsulated extract.

Biopolímero/cápsula	T_g (°C)
Goma arábiga	135.22 ± 0.3[a]
Alginato de sodio	120.65 ± 0.4[c]
Cápsulas sin extracto	130.87 ± 0.3[a]
Cápsulas con extracto	129.45 ± 0.5[a]

Los resultados expresan la media ± desviación estándar. Las letras diferentes significan diferencia significativa (P < 0.05).

Tabla 1. Análisis térmico de cápsulas de goma arábiga, alginato de sodio y extracto de hojas de mango.
Table 1. Thermal analysis of arabic gum, sodium alginate, and mango leaf extract capsules.

Muestra	Eventos térmicos por TGA						
	Rango (°C)	Inicio (°C)	Punto medio (°C)	Final (°C)	T_d (°C)	Pérdida de peso (%)	Atribución de la pérdida de peso
Extracto	25-110	52.05	76.38	101.07		4.18	Pérdida de agua libre y ligada
	110-410	175.5	233.59	285.30	233.59	47.57	Descomposición del extracto
	410-800	450.08	518.08	583.64		25.4	Minerales
						22.84	Masa residual
Cápsulas vacías	25-190	29.03	52.60	69.18		8.91	Pérdida de agua libre y ligada
	190-372	273.98	295.90	319.20	295.90	67.35	Descomposición de goma arábiga y alginato de sodio
	373-800	384.80	321.07	792.69		12.66	Minerales
						11.07	Masa residual
Cápsulas + extracto	25-130	29.76	54.26	72.09		8.02	Pérdida de agua libre y ligada
	130-563	255.92	290.82	326.33	290.82	71.10	Descomposición de goma arábiga, alginato de sodio y extracto de hoja de mango
	563-800	647.54	713.59	785.83		6.47	Minerales
						14.39	Masa residual

Td: temperatura de descomposición.

Evaluación de los enlaces producidos en las cápsulas por FTIR

El análisis FTIR de las cápsulas reveló los enlaces característicos de la goma arábiga y el alginato de sodio (Tabla 3). Estos enlaces estuvieron presentes en ambas cápsulas. El primero de los enlaces encontrados en las cápsulas sin extracto fue un grupo hidroxilo, siendo el primero de estos a 3300-3280 cm^{-1}. Además, se observó un enlace C-O, correspondiente a un anillo de piranosa a 1075 - 1000 cm^{-1} (Tabla 3). En cuanto al alginato de sodio Nair *et al*. (2020) reportaron un grupo hidroxilo a longitud de onda de 3281 cm^{-1} y el anillo de piranosa característico del alginato de sodio a 1023 cm^{-1}. Así mismo, los enlaces que no están presentes en las cápsulas sin extracto, son característicos del extracto de las hojas de mango, siendo el enlace C=O reportado por Bello *et al*. (2014), el grupo característico en el extracto de hoja de mango. Este enlace está presente en una gran proporción de los compuestos ya anteriormente identificado en las hojas de mango, entre los más representativos son las xantonas, los ácidos fenólicos y flavonol (Kumar *et al*., 2021). Por otra parte, el enlace N-O reportado por Adelaja *et al*. (2019) representa el grupo de los nitroderivados en el extracto (Tabla 3). Este grupo puede ser utilizado para su conversión a grupos carbonilos utilizando la reacción de Nef (Ballini y Petrini, 2004).

Fotoestabilidad de las cápsulas

La elección de un material de pared es un punto crítico para la encapsulación. Según Tang *et al.* (2020), la goma arábiga posee excelentes capacidades para proveer protección efectiva. Esta propiedad se demuestra en la Figura 1**,** en la que se observa como la combinación de los materiales de pared utilizados proveen foto protección efectiva del 80 % al extracto, respecto al extracto expuesto a radiación UV sin encapsular (32 % de oxidación relativa) después de 148 h de exposición. Los datos obtenidos son similares a los reportados por Ramos-Hernández *et al*. (2018) quienes obtuvieron una fotoprotección del 88 % en la encapsulación de *β*-caroteno utilizando fructanos de agave. La fotoprotección se debió a que los polisacáridos por su estructura tienen la capacidad de absorber y reflejar la radiación UV a través de los grupos carbonilo que funcionan como cromóforos, evitando que las radiaciones penetren al interior de las cápsulas (Wondraczek *et al*., 2011).

Tabla 3. Tipos de enlaces producidos en las cápsulas de goma arábiga y alginato de sodio con y sin extracto.
Table 3. Types of bonds produced in arabic gum and sodium alginate capsules with and without extract.

Enlaces obtenidos por FTIR	Número de onda (cm^{-1})	Modo del enlace	Tipo de enlace reportado
OH	3300-3280	Estiramiento	Hidroxilo
C-O	1075-1000	Estiramiento	Anillo de piranosa
C=O	1700-1600	Estiramiento	Carbonilo
N-O	950-920	Estiramiento	Nitroderivado

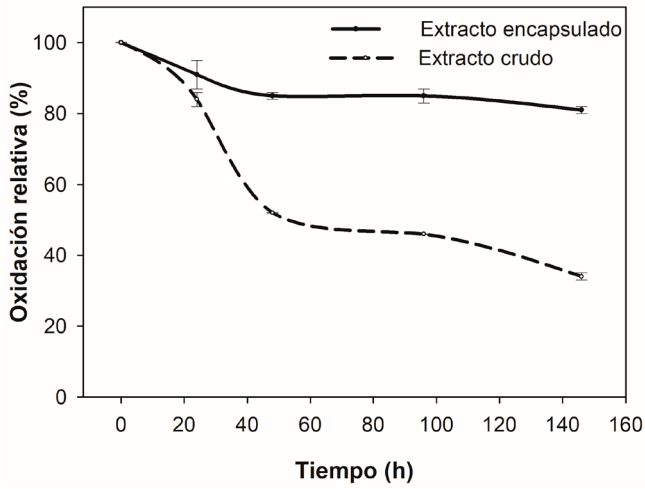


Figura 1. Fotoestabilidad del extracto encapsulado y extracto crudo de hojas de mango. Los puntos representan el valor medio y las líneas verticales la desviación estándar.
Figure 1. Photostability of encapsulated extract and crude extract of mango leaves. The points represent the mean value and the vertical lines the standard deviation.

Inhibición *in vivo* de los hongos de interés comercial

La efectividad de las cápsulas obtenidas se evaluó mediante pruebas de inhibición *in vivo* en diferentes frutas de interés comercial, tales como naranja y arándano. La prueba de severidad de *P. digitatum* en naranjas mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los controles y el tratamiento con las cápsulas. Se observó que las cápsulas con extracto de hoja de mango redujeron en un 70 % la lesión causada por *P. digitatum* (Figura 2A). Sin embargo, no existieron diferencias significativas respecto a la incidencia (80 %) (Figura 2B). Los resultados obtenidos superan a los presentados por Pérez-Alfonso *et al*. (2012), quienes utilizaron por separado carvacrol y timol, logrando reducir la severidad de *P. digitatum* en un 40 % después de 72 h en naranjas utilizando concentraciones de 50 a 250 µL/L.

De acuerdo a la composición fitoquímica del extracto, según Martínez *et al*. (2017) el ácido clorogénico puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular de los fitopatógenos. Por otra parte, el ácido cafeico induce a la desorganización de la membrana celular (Santiago *et al*., 2010). Los efectos que puede producir el ácido cafeico son malformaciones de las hifas, desorganización de la membrana celular y fuga de líquido citoplasmático (Gatto *et al*., 2011). Además, el ácido cumárico produce una alteración de la membrana debido a los grupos hidroxilos (Hernández *et al*., 2021). Por otra parte, la alta reducción de la severidad se puede atribuir a que los materiales utilizados para la encapsulación pueden formar películas en el epicarpio del fruto, facilitando la adherencia y liberación de los compuestos encapsulados (Felton, 2013; Chaumun *et al*., 202).

Adicionalmente, los arándanos empleados como control mostraron un 100 % de incidencia de *B. cinerea*, mientras que los arándanos tratados con las cápsulas mostraron un 0 % de incidencia (Figura 3). Este resultado indicó que las cápsulas con extracto de hoja de mango pueden emplearse como

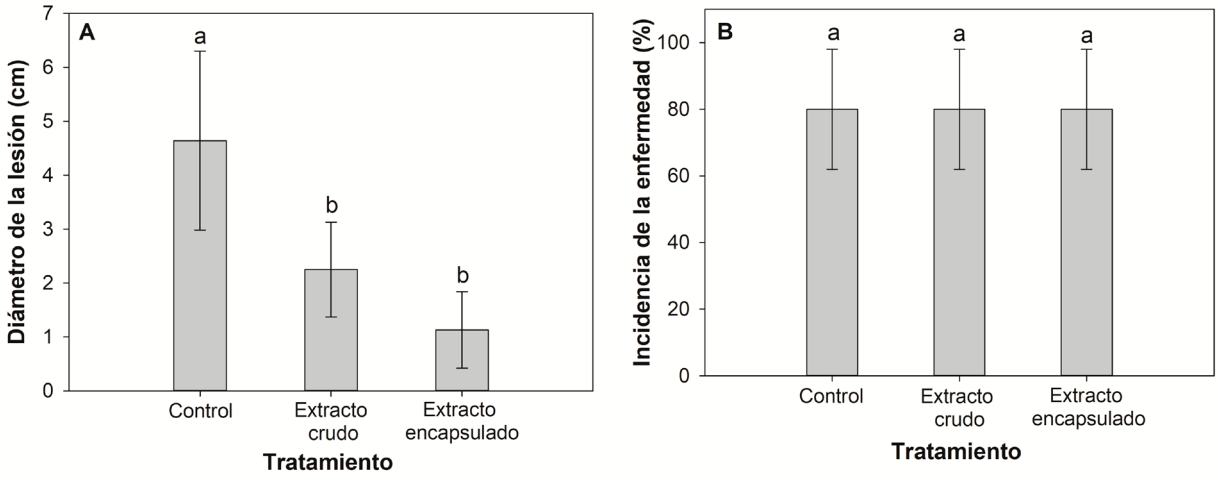


Figura 2. Actividad antifúngica del extracto de hoja de mango crudo y encapsulado contra *P. digitatum* en naranjas. En cada gráfica los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes (P < 0.05). Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar. A) diámetro de la lesión y B) incidencia de la enfermedad.
Figure 2. Antifungal activity of crude and encapsulated mango leaf extract against *P. digitatum* in oranges. In each graph, the values with the same letter are not statistically different (P < 0.05). The bars represent the mean and the vertical lines the standard deviation. A) lesion diameter and B) incidence of the disease.

método preventivo en estos frutos. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Romeo *et al*. (2015) quienes al utilizar una concentración de 10 mg/mL de extracto fenólico de hojas de zumaque redujeron la incidencia en un 92 %.

En lo que respecta a *B. cinerea*, el efecto del ácido clorogénico podría causar lisis celular y cambios en la permeabilidad de la membrana (Ma *et al*., 2018). Los compuestos fenólicos como el ácido cafeico pueden causar cambios en la morfología celular y en la membrana (Rao *et al*., 2010). Asimismo, el ácido cumárico puede desestabilizar la membrana celular afectando con ello su polaridad (Morales *et al*., 2017).

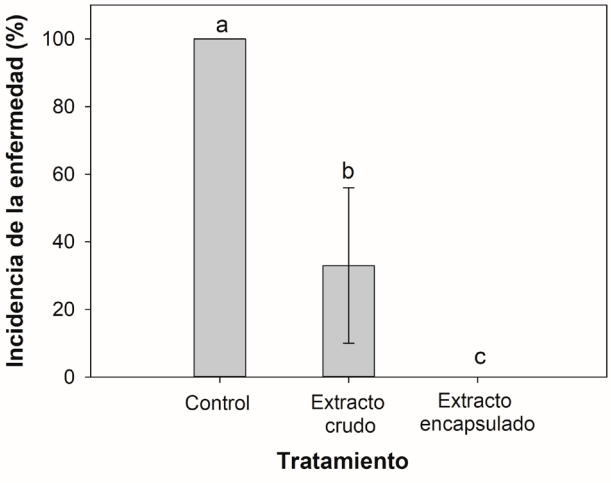


Figura 3. Incidencia de *B. cinerea* en frutos de arándano tratados con extracto de hoja de mango crudo y encapsulado. Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes (P < 0.05). Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar.
Figure 3. Incidence of *B. cinerea* in blueberry fruits treated with crude and encapsulated mango leaf extract. Values with the same letter are not statistically different (P < 0.05). Bars represent the mean and vertical lines the standard deviation.

CONCLUSIONES

El secado por aspersión, con el uso de materiales de pared adecuados, es una tecnología eficiente para la encapsulación, con la que se obtienen partículas con características fisicoquímicas deseables que permiten la estabilización de los CAVB. Las cápsulas permitieron una liberación adecuada del extracto para el control de los hongos fitopatógenos, reduciendo la incidencia de *P. digitatum* en naranjas y severidad de *B. cinerea* en arándanos. Se demostraron las excelentes capacidades de la goma arábiga y alginato de sodio para crear una coraza alrededor de los compuestos de alto valor biológico con efecto termo y fotoprotector. Las microcápsulas de extracto polifenólico de hoja de mango se presentan como una alternativa viable y efectiva para el control de frutos de interés comercial como naranjas y arándanos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para los estudios de posgrado dentro del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic. Los autores agradecen al TecNM por el soporte financiero del proyecto 19433-24P.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

Adelaja, O.A., Bankole, A.C., Oladipo, M.E. y Lene, D. B. 2019. Biosorption of Hg (II) ions, Congo red and their binary

mixture using raw and chemically activated mango leaves. International Journal of Energy and Water Resources 3(1): 1-12. https://doi.org/10.1007/s42108-019-00012-0

Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. y Rafiee, S. 2013. Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. Food and Bioprocess Technology. 6(6): 1561-1569. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0796-7

Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P.P., Barros, L. y Ferreira, I.C.F.R. 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. Food & Function. 12(1): 14-29. https://doi.org/10.1039/D0FO02324H

Al-Maqtari, Q.A., Mohammed, J.K., Mahdi, A.A., Al-Ansi, W., Zhang, M., Al-Adeeb, A., Wei, M., Phyo, H.M. y Yao, W. 2021. Physicochemical properties, microstructure, and storage stability of *Pulicaria jaubertii* extract microencapsulated with different protein biopolymers and gum arabic as wall materials. International Journal of Biological Macromolecules. 187: 939-954. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.180

Arepally, D., Reddy, R.S., y Goswami, T.K. 2020. Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. In Current Research in Food Science 3: 235-242. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.001

Ayón-Macías, K.D., Castañeda-Andrade, A.J., Ragazzo-Sánchez, J.A. y Calderón-Santoyo, M. 2023. Application of nanofibers with jackfruit leaf extract via electrospinning to control phytopathogens in *Averrhoa carambola* L. Polymer Bulletin. https://doi.org/10.1007/s00289-023-04815-4

Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A. y Mussatto, S.I. 2017. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. Food Chemistry. 237: 623-631. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142

Ballini, R. y Petrini, M. 2004. Recent synthetic developments in the nitro to carbonyl conversion (Nef reaction). Tetrahedron. 60(5): 1017-1047. https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.11.016

Bello, O.S., Bello, O.U. y Lateef, I.O. 2014. Adsorption characteristics of mango leaf (*Mangifera indica*) powder as adsorbent for malachite green dye removal from aqueous solution. Covenant Journal of Physical and Life Sciences 2(1).

Bhattachar, S.N., Deschenes, L.A. y Wesley, J.A. 2006. Solubility: it's not just for physical chemists. Drug Discovery Today. 11(21–22): 1012-1018. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.09.002

Calderón-Santoyo, M., González-Cruz, E.M., Iñiguez-Moreno, M., Ramos-Martínez, O., Burgos-Hernández, A. y Ragazzo-Sánchez, J.A. 2022. Microencapsulation of phenolic extract from sea grape (*Coccoloba uvifera L.*) with antimutagenic activity. Chemistry & Biodiversity. 19(11). https://doi.org/10.1002/cbdv.202200806

Chaumun, M., Goëlo, V., Ribeiro, A.M., Rocha, F. y Estevinho, B.N. 2020. *In vitro* evaluation of microparticles with *Laurus nobilis* L. extract prepared by spray-drying for application in food and pharmaceutical products. Food and Bioproducts Processing. 122: 124-135. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.011

Chegini, G.R. y Ghobadian, B. 2005. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. Drying Technology. 23(3): 657-668. https://doi.org/10.1081/DRT-200054161

Chew, S.C., Tan, C.P. y Nyam, K.L. 2018. Microencapsulation of refined kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) seed oil by spray drying using β-cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate. Journal of Food Engineering. 237: 78-85. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.016

Chiou, D. y Langrish, T.A.G. 2007. Crystallization of amorphous components in spray-dried powders. Drying Technology. 25(9): 1427-1435. https://doi.org/10.1080/07373930701536718

Díaz-Montes, E. 2023. Wall materials for encapsulating bioactive compounds via spray-drying: A review. Polymers. 15(12): 2659. https://doi.org/10.3390/polym15122659

Dierings de Souza, E.J., Kringel, D.H., Guerra Dias, A.R. y da Rosa Zavareze, E. 2021. Polysaccharides as wall material for the encapsulation of essential oils by electrospun technique. Carbohydrate Polymers. 265: 118068. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118068

Felton, L.A. 2013. Mechanisms of polymeric film formation. International Journal of Pharmaceutics. 457(2): 423-427. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.027

Ferrari, C.C., Marconi Germer, S.P., Alvim, I.D. y de Aguirre, J.M. 2013. Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. Drying Technology. 31(4): 470-478. https://doi.org/10.1080/07373937.2012.742103

Fujimori, M., Kadota, K., Kato, K., Seto, Y., Onoue, S., Sato, H., Ueda, H. y Tozuka, Y. 2016. Low hygroscopic spray-dried powders with trans-glycosylated food additives enhance the solubility and oral bioavailability of ipriflavone. Food Chemistry. 190: 1050-1055. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.081

Gatto, M.A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N.A., Nigro, F., Vanadia, S. y Di Venere, D. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology. 61(1): 72-82. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.02.005

George, T.T., Oyenihi, A.B., Rautenbach, F. y Obilana, A.O. 2021. Characterization of *Moringa oleifera* leaf powder extract encapsulated in maltodextrin and/or gum arabic coatings. Foods. 10(12): 3044. https://doi.org/10.3390/foods10123044

González, E., Gómez-Caravaca, A.M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A. y Robert, P. 2019. Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 279: 40-48. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.127

Guamán-Balcázar, M.C., Montes, A., Pereyra, C. y de la Ossa, E.M. 2017. Precipitation of mango leaves antioxidants by supercritical antisolvent process. Journal of Supercritical Fluids, 128: 218-226. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.031

Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., Galván, A.I., Merchán, A.V., Pérez Nevado, F., Aranda, E., Serradilla, M.J., Córdoba, M. de G. y Martín, A. 2021. Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. Fungal Biology. 125(2): 143-152. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.005

Iñiguez-Moreno, M., Ragazzo-Sánchez, J.A., Barros-Castillo, J.C., Solís-Pacheco, J.R. y Calderón-Santoyo, M. 2021.

Characterization of sodium alginate coatings with *Meyerozyma caribbica* and impact on quality properties of avocado fruit. Lwt- Food Science and Technology. 152: 112346. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112346

Ionashiro, E.Y., Caires, F.J., Siqueira, A.B., Lima, L.S. y Carvalho, C.T. 2012. Thermal behaviour of fumaric acid, sodium fumarate and its compounds with light trivalent lanthanides in air atmosphere. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 108(3): 1183-1188. https://doi.org/10.1007/s10973-011-1660-0

Islam, M.I.U., Sherrell, R. y Langrish, T.A.G. 2010. An investigation of the relationship between glass transition temperatures and the crystallinity of spray-dried powders. Drying Technology. 28(3): 361-368. https://doi.org/10.1080/07373931003641586

Jimenez-Sánchez, D.E., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., Gaston-Peña, C., Luna-Solano, G. y Ragazzo-Sánchez, J.A. 2020. Use of native agave fructans as stabilizers on physicochemical properties of spray-dried pineapple juice. Drying Technology. 38(3): 293-303. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1565575

Jimenez-Sánchez, D.E., Calderón-Santoyo, M., Picart-Palmade, L., Luna-Solano, G., Ortiz-Basurto, R.I., Bautista-Rosales, P.U. y Ragazzo-Sánchez, J.A. 2017. Effect of addition of native agave fructans on spray-dried chayote (*Sechium edule*) and pineapple (*Ananas comosus*) juices: Rheology, microstructure, and water sorption. Food and Bioprocess Technology. 10(11): 2069-2080. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1974-4

Juarez-Enriquez, E., Olivas, G.I., Zamudio-Flores, P.B., Ortega-Rivas, E., Perez-Vega, S. y Sepulveda, D.R. 2017. Effect of water content on the flowability of hygroscopic powders. Journal of Food Engineering. 205: 12-17. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.024

Karagozlu, M., Ocak, B. y Özdestan-Ocak, Ö. 2021. Effect of tannic acid concentration on the physicochemical, thermal, and antioxidant properties of gelatin/gum arabic–walled microcapsules containing *Origanum onites* L. essential Oil. Food and Bioprocess Technology. 14(7): 1231-1243. https://doi.org/10.1007/s11947-021-02633-y

Karrar, E., Mahdi, A.A., Sheth, S., Mohamed-Ahmed, I.A., Manzoor, M.F., Wei, W. y Wang, X. 2021. Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on the microencapsulation of gurum seed oil using a spray-drying method. International Journal of Biological Macromolecules. 171: 208-216. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.045

Klepacka, J., Gujska, E. y Michalak, J. 2011. Phenolic compounds as cultivar- and variety-distinguishing factors in some plant products. Plant Foods for Human Nutrition. 66(1), 64-69. https://doi.org/10.1007/s11130-010-0205-1

Kuck, L.S., Wesolowski, J.L. y Noreña, C.P.Z. 2017. Effect of temperature and relative humidity on stability following simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordo grape skin phenolic extract produced with different carrier agents. Food Chemistry. 230: 257-264. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.038

Kumar, M., Saurabh, V., Tomar, M., Hasan, M., Changan, S., Sasi, M., Maheshwari, C., Prajapati, U., Singh, S., Prajapat, R.K., Dhumal, S., Punia, S., Amarowicz, R. y Mekhemar, M. 2021. Mango (*Mangifera indica L.*) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. Antioxidants. 10(2): 299. https://doi.org/10.3390/antiox10020299

Li, J., Zhai, J., Dyett, B., Yang, Y., Drummond, C.J. y Conn, C.E. 2021. Effect of gum arabic or sodium alginate incorporation on the physicochemical and curcumin retention properties of liposomes. Lwt- Food Science and Technology. 139: 110571. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110571

Liudvinaviciute, D., Rutkaite, R., Bendoraitiene, J. y Klimaviciute, R. 2019. Thermogravimetric analysis of caffeic and rosmarinic acid containing chitosan complexes. Carbohydrate Polymers. 222: 115003. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115003

Ma, L., He, J., Liu, H. y Zhou, H. 2018. The phenylpropanoid pathway affects apple fruit resistance to *Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology. 166(3): 206-215. https://doi.org/10.1111/jph.12677

Morales, J., Mendoza, L. y Cotoras, M. 2017. Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the antifungal action of coumaric acid against *Botrytis cinerea*. Journal of Applied Microbiology. 123(4): 969-976. https://doi.org/10.1111/jam.13540

Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J., Rocha-Guzmán, N., Moreno-Jiménez, M., Medina-Torres, L. y González-Laredo, R.F. 2020. Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 19(2): 491-521. https://doi.org/10.24275/rmiq

Nair, R.M., Bindhu, B. y Reena, V.L. 2020. A polymer blend from gum arabic and sodium alginate - preparation and characterization. Journal of Polymer Research. 27(6): 154. https://doi.org/10.1007/s10965-020-02128-y

Navarro-Flores, M.J., Ventura-Canseco, L.M.C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R. y Abud-Archila, M. 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. Journal of Food Science and Technology. 57(11): 4111-4122. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T. y Bugarski, B. 2013. Encapsulation systems in the food industry. En *Food Engineering Series*. V. Nedović., A. Kaluševic., V. Manojlović., T. Petrović y B. Bugarski (ed.), pp 229-253. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7906-2_13

Owusu-Ware, S.K., Chowdhry, B.Z., Leharne, S.A. y Antonijević, M.D. 2013. Quantitative analysis of overlapping processes in the non-isothermal decomposition of chlorogenic acid by peak fitting. Thermochimica Acta. 565: 27-33. https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.04.029

Pérez-Alfonso, C.O., Martínez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D. y Castillo, S. 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. International Journal of Food Microbiology. 158(2): 101-106. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.002

Ramos-Hernández, J., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M., Ortiz-Basurto, R., Prieto, C. y Lagaron, J. 2018. Use of electrosprayed agave fructans as nanoencapsulating hydrocolloids for bioactives. Nanomaterials. 8(11): 868. https://doi.org/10.3390/nano8110868

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. y Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium

stress and inhibition of the TOR Pathway. *A*ntimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(12): 5062-5069. https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10

Ribeiro, A.M., Estevinho, B.N. y Rocha, F. 2019. Spray drying encapsulation of elderberry extract and evaluating the release and stability of phenolic compounds in encapsulated powders. Food and Bioprocess Technology. 12(8): 1381-1394. https://doi.org/10.1007/s11947-019-02304-z

Rodríguez-Ramírez, J., Méndez-Lagunas, L., López-Ortiz, A. y Torres, S.S. 2012. True density and apparent density during the drying process for vegetables and fruits: A review. Journal of Food Science. 77(12): R146-R154. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02990.x

Romeo, F., Ballistreri, G., Fabroni, S., Pangallo, S., Nicosia, M., Schena, L. y Rapisarda, P. 2015. Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. Molecules. 20(7): 11941-11958. https://doi.org/10.3390/molecules200711941

Ruiz-Montañez, G., Calderón-Santoyo, M., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Jiménez-Sánchez, D.E. y Ragazzo-Sánchez, J.A. 2019. Ultrasound-assisted microencapsulation of jackfruit extract in eco-friendly powder particles: Characterization and antiproliferative activity. Journal of Dispersion Science and Technology. 40(10): 1507-1515. https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1566923

Rzokee, A.A. y Ahmad, A. 2014. Synthesis, spectroscopic studies and thermal analysis of charge-transfer complex of 2,2′ -bipyridine with 4-hydroxybenzoic acid in different polar solvents. Journal of Molecular Structure. 1076: 453-460. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.08.002

Safeer-Abbas, M., Afzaal, M., Saeed, F., Asghar, A., Jianfeng, L., Ahmad, A., Ullah, Q., Elahi, S., Ateeq, H., Shah, Y.A., Nouman, M. y Shah, M.A. 2023. Probiotic viability as affected by encapsulation materials: Recent updates and perspectives. International Journal of Food Properties. 26(1): 1324-1350. https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2213408

Santiago, R., Blanch, M., Vicente, C. y Legaz, M.E. 2010. *In vitro* effects of caffeic acid upon growth of the fungi *Sporisorium scitamineum*. Journal of Plant Interactions. 5(3): 233-240. https://doi.org/10.1080/17429141003663860

Sarabandi, K., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S. y Mohammadi, A. 2019. Application of gum arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. International Journal of Biological Macromolecules. 140: 59-68. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133

Savjani, K.T., Gajjar, A.K. y Savjani, J.K. 2012. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. ISRN Pharmaceutics. 2012: 1-10. https://doi.org/10.5402/2012/195727

Shimanovich, U., Bernardes, G.J.L., Knowles, T.P.J. y Cavaco-Paulo, A. 2014. Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications. Chemical Society Reviews. 43(5): 1361-1371. https://doi.org/10.1039/C3CS60376H

Stanisavljević, N., Stanisavljević, S., Šavikin, K., Kaluševićkaluševi´ Kalušević, A., Nedović, V., Nedović, N., Bigovićbigovi´ Bigović, D. y Janković, T.J. 2018. Application of gum arabic in the production of spray-dried chokeberry polyphenols, microparticles characterization and in vitro digestion method. Lekovite Sirovine. 38: 1-16. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1364/leksir1838009C

Taiwo, B.J., Miller, A.H., Fielding, A.J., Sarker, S.D., van Heerden, F.R. y Fatokun, A.A. 2024. Ceibinin, a new positional isomer of mangiferin from the inflorescence of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), elicits similar antioxidant effect but no anti-inflammatory potential compared to mangiferin. Heliyon. 10(1): e23335. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23335

Tao, T., Ding, Z., Hou, D., Prakash, S., Zhao, Y., Fan, Z., Zhang, D., Wang, Z., Liu, M. y Han, J. 2019. Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by spray drying. Journal of Food Engineering. 252: 10-17. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.009

Tomsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., Durrieu, V. y Cinkmanis, I. 2020. Microencapsulation of horseradish (*Armoracia rusticana L*.) juice using spray-drying. Foods. 9(9): 1332. https://doi.org/10.3390/foods9091332

Tonon, R.V., Freitas, S.S. y Hubinger, M.D. 2011. Spray drying of açaí (*Euterpe oleraceae mart*.) juice: Effect of inlet air temperature and type of carrier agent. Journal of Food Processing and Preservation. 35(5): 691-700. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00518.x

Wondraczek, H., Kotiaho, A., Fardim, P. y Heinze, T. 2011. Photoactive polysaccharides. Carbohydrate Polymers. 83(3): 1048-1061. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.014

Yazdi, A.P.G., Barzegar, M., Sahari, M.A. y Ahmadi-Gavlighi, H. 2021. Encapsulation of pistachio green hull phenolic compounds by spray drying. Journal of Agricultural Science and Technology. 23(1): 51-64. https://doi.org/20.1001.1.16807073.2021.23.1.18.1

Zhang, C., Khoo, S.L.A., Swedlund, P., Ogawa, Y., Shan, Y. y Quek, S.Y. 2020. Fabrication of spray-dried microcapsules containing noni juice using lends of maltodextrin and gum acacia: Physicochemical properties of powders and bioaccessibility of bioactives during *in vitro* digestion. Foods. 9(9): 1316. https://doi.org/10.3390/foods9091316

Ziaee, A., Albadarin, A.B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E. y Walker, G. 2019. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 127: 300-318. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

La Pandemia de COVID-19 y su efecto en la nutrición de mujeres y niños en zonas marginadas de Hermosillo

The COVID-19 pandemic and its impact on the nutrition of women and children in marginalized areas of Hermosillo

Andrea Félix Gutiérrez[1], Gloria Elena Portillo Abril[1], María Isabel Grijalva Haro[1], Trinidad Quizán Plata[2], Alma Delia Contreras Paniagua[1], María Isabel Ortega Vélez[1]*

[1] Departamento de Nutrición Pública y Salud del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Hermosillo, Sonora, México. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP. 83304.

[2] Departamento de Ciencias Quimíco-Biológicas de la Universidad de Sonora (UNISON). Hermosillo, Sonora, México. Blvd. Luis Encinas J, Calle Av. Rosales y Centro. CP. 83000.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic had significant repercussions on the nutritional health of the population in Hermosillo, Mexico. This study analyzed the consequences of the food environment and nutritional food insecurity in Hermosillo households with medium and high levels of marginalization. In 2021, 104 women and 41 children participated in this study, with data contrasted with information from 2019. Changes in the purchasing patterns of women were identified ($p = 0.001$), showing a preference for convenience stores, linked to a larger waist circumference ($p = 0.001$). Among children, there was a 6.5 % increase in the prevalence of overweight and obesity according to BMI-for-age Z score, and it was negatively associated with grocery shopping at convenience stores ($p = 0.02$). Additionally, an increase in the mean BMI of women was observed, rising from 29.6 to 30.5 ($p = 0.05$). There was also a 9 % rise in moderate nutritional food insecurity cases after the pandemic. A correlation was found between food acquisition locations and the nutritional status of women and children during the pandemic.

Keywords: Food insecurity, food environment, grocery shopping, convenience stores.

RESUMEN

La pandemia del COVID-19 tuvo repercusiones en la nutrición de la población de Hermosillo, México. Este estudio se centró en analizar las consecuencias en el ambiente alimentario y la inseguridad alimentaria nutricional de mujeres y niños hermosillenses con niveles de marginación medio y alto. Durante 2021 participaron 104 mujeres y 41 niños, cuyos datos se contrastaron con información de 2019. Se identificaron cambios en los patrones de compra de las mujeres ($p = 0.001$), con una preferencia hacia las tiendas de conveniencia, relacionándose con una mayor circunferencia de cintura ($p = 0.04$). En los niños se presentó un aumento del 6.5 % en la prevalencia de sobrepeso y obesidad según el puntaje Z del IMC para la edad; a su vez, este último se asoció negativamente con la compra de alimentos en las tiendas de conveniencia ($p = 0.02$). Entre las mujeres adultas se observó un aumento en la media del IMC (29.6 a 30.5; $p = 0.05$). Además, se encontró un aumento de 9 % en la inseguridad alimentaria nutricional moderada, después de la pandemia. Ello indica que existió relación entre los lugares de adquisición de alimentos y el estado nutricional de mujeres y niños durante la pandemia.

Palabras clave: Inseguridad alimentaria, ambiente alimentario, compra de alimentos, tiendas de conveniencia.

INTRODUCCIÓN

A finales de 2019, el mundo fue testigo del surgimiento de un nuevo tipo de coronavirus en Wuhan, China, que posteriormente se denominó COVID-19 (OMS, 2020). Esta enfermedad se convirtió rápidamente en una pandemia global, afectando a la salud pública, la economía y la sociedad en su conjunto (Albarrán-Alvarado *et al*., 2020; Shamah-Levy *et al*., 2021). México, al igual que otros países, experimentó cambios significativos en diversos ámbitos debido a esta crisis sanitaria. El impacto del COVID-19 fue devastador, posicionándose como una de las principales causas de muerte en México, junto con enfermedades del corazón y diabetes mellitus (INEGI, 2021). Estas últimas dos, relacionadas directamente con el estilo de vida de las personas, particularmente en términos de actividad física y alimentación.

A medida que la pandemia se prolongaba, los problemas asociados con la seguridad alimentaria nutricional también se intensificaron, lo que limitó el suministro de alimentos saludables, especialmente entre los grupos de población más desfavorecidos (Romo-Avilés y Ortiz-Hernández, 2018; UCSF, 2021). Se ha documentado que la inseguridad alimentaria nutricional (IAN) se asocia con la falta de disponibilidad y acceso económico a alimentos nutritivos, con entornos alimentarios insalubres y la desigualdad elevada y persistente (FAO, 2024). Hermosillo es una ciudad que refleja la diversidad socioeconómica de México y por lo tanto, con un efecto desigual del impacto de la pandemia en distintos grupos sociales. Las familias que ya vivían en condiciones de marginación experimentaron un aumento de la IAN (Contreras-Navarro *et al*., 2019; Huesca-Reynoso *et al*., 2023).

El ambiente alimentario (AA), que comprende el entorno físico, económico, político y sociocultural relacionado con la disponibilidad y calidad de los alimentos, sufrió transfor-

*Autor para correspondencia: María Isabel Ortega Vélez
Correo-e: iortega@ciad.mx
Recibido: 15 de septiembre de 2024
Aceptado: 7 de noviembre de 2024
Publicado: 6 de diciembre de 2024

maciones durante la pandemia, sobre todo en hogares con dificultades económicas (FSIN, 2021; Ahmed *et al*., 2020). Estos cambios influyeron en las decisiones alimentarias de las familias, afectando su seguridad alimentaria. Según datos del CONEVAL y la encuesta ENCOVID-19 Infancia (UNICEF, 2021), la seguridad alimentaria en los hogares con niños disminuyó de forma alarmante, ya que solo el 23 % de ellos reportó niveles adecuados de seguridad alimentaria en octubre de 2021, frente al 41 % en los hogares sin niños.

Dada la relevancia de estos temas y la necesidad de comprender mejor las implicaciones de la pandemia en la salud y nutrición de grupos reconocidos vulnerables en situaciones de estrés económico o de salud, en este caso mujeres y niños que habitan en colonias de marginación media y alta en Hermosillo, Sonora, el presente estudio se propuso analizar el impacto de la pandemia por COVID-19 en el AA, mediante el análisis de los lugares de compra de alimentos en los hogares, los cambios de la IAN y el estado nutricional de los participantes. El protocolo del estudio obtuvo la aprobación del comité de ética en Investigación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo el número de documento CEI/006-1/2021. La comprensión del impacto de la emergencia epidemiológica por COVID-19 en la seguridad alimentaria de los hogares y su impacto en el estado de nutrición de la población pretende contribuir al diseño de respuestas tempranas de intervención enfocados en mejorar la seguridad alimentaria nutricional en las comunidades más vulnerables de Hermosillo, con la meta de mitigar los efectos de futuras crisis, tanto sanitarias como económicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio observacional, comparativo y analítico. En este se examinan y comparan las diferencias entre grupos específicos en relación con variables determinadas, sin intervenir o modificar las condiciones existentes.

Muestreo

El muestreo se llevó a cabo con la participación de mujeres residentes en colonias de Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEB) con Grado de Marginación Urbano (GMU) medio y alto en Hermosillo, Sonora (CONAPO, 2017). Se seleccionaron estas áreas debido a su vulnerabilidad socioeconómica, buscando identificar cómo la pandemia afectó la seguridad alimentaria en estos contextos específicos. Se utilizó un muestreo probabilístico estratificado bietápico, formando tres conglomerados clasificados según variables relevantes. La elección de este método garantizó una representación estadística de las mujeres y niños que habitan en zonas de marginación media y alta. Se obtuvo una muestra representativa de 38 AGEB con GMU medio y alto.

Los criterios de inclusión y exclusión para las participantes fueron: vivir en una zona geográfica de marginación media o alta previamente seleccionada por el muestreo, tener más de 18 años y estar involucrada con la preparación de alimentos en el hogar. Esto fue importante para asegurar que las participantes tuvieran un rol activo en las decisiones alimentarias. Si en el hogar también vivían niños entre 5 y 11 años, se pedía la autorización para su inclusión en el estudio. En ese rango de edad se han documentado los aumentos mayores en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños mexicanos y especialmente durante la pandemia de COVID-19 (Ortega-Vélez *et al*., 2023).

Un total de 104 mujeres y 41 niños aceptaron participar en la investigación realizada entre agosto y noviembre de 2021. De la muestra original se tuvo una pérdida por no respuesta de 9 participantes, después de tres intentos de contacto mediante llamadas telefónicas y visitas domiciliarias.

Entrevistas

Se realizaron entrevistas utilizando cuestionarios sociodemográficos para determinar el nivel socioeconómico familiar de las mujeres, basados en los indicadores de la Asociación Mexicana de Agencias de Investigación de Mercado (AMAI), que derivan de los datos de encuestas del INEGI (AMAI, 2020; AMAI, 2022).

Encuestas Dietarias

Se emplearon recordatorios de 24 h (Ferrari, 2013) y se tomaron mediciones antropométricas en niños y mujeres (OMS, 1995). Se utilizó la herramienta NEMS-P adaptada a los modismos regionales para evaluar la percepción del ambiente alimentario en las mujeres adultas (Green y Glanz, 2015). Se recopilaron datos sobre la seguridad alimentaria nutricional (SAN) utilizando la Escala de Seguridad Alimentaria para las Familias del Noroeste de México (Quizán-Plata, 2006).

Antropometría

Las mediciones antropométricas en las mujeres adultas comprendieron el peso y la talla, con los cuales se calculó el índice de masa corporal (IMC); se midió, además, la circunferencia de cintura (CC), para determinar obesidad central. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021), para adultos un IMC mayor o igual a 25 indica sobrepeso y un IMC mayor o igual a 30 se clasifica como obesidad. El riesgo de salud aumenta cuando la CC es mayor o igual a 80 cm en mujeres y mayor o igual a 90 cm en hombres (Campos-Nonato *et al*., 2023).

En los niños, se midieron el peso (kg) y la estatura (cm), para después calcular el puntaje Z del IMC para la edad, utilizando el software ANTHRO-PLUS (WHO, 2024). Los datos se clasificaron considerando las desviaciones estándar (DE) recomendadas a partir de la distribución del puntaje Z del IMC para la edad; así, < - 2 DE se considera desnutrición aguda, entre - 2 y 0.99 DE como peso adecuado y > + 1 DE como sobrepeso u obesidad.

Análisis Estadístico

La información se capturó en bases de datos de Excel. Se utilizó el Software SPSS versión 2020 para los análisis descriptivos y el STATA versión 16 (2022) para el análisis de regresión

lineal, considerando un nivel de significancia ($p \leq 0.05$). En el análisis multivariado, se consideraron los principios de interacción, colinealidad y homogeneidad. Se ajustó el análisis considerando variables confusoras como estado civil de las mujeres, ocupación de las mujeres y la edad de mujeres y niños.

RESULTADOS

Características Generales

Se compararon de forma detallada las características sociodemográficas de las participantes con un estudio similar de 2019 que reunió información de 136 mujeres.

Como se observa en la Tabla 1, los datos muestran cambios significativos en el estado civil de las mujeres (p = 0.006), con aumento en el porcentaje de mujeres casadas (de 41.9 % en 2019 a 55.8 % en 2021). La mayoría de los hogares se clasificaron con grado de marginación medio en ambos periodos (74.2 % en 2019 y 75.9 % en 2021). La ocupación predominante entre las mujeres fue ama de casa (68.4 % en 2019 y 67.9 % en 2021) (Tabla I).

Efecto de la Pandemia en la Inseguridad Alimentaria Nutricional

Se categorizó la IAN en cuatro niveles: Sin inseguridad alimentaria (SA), IAN leve, IAN moderada y IAN severa. En 2019, el 20.6 % de los hogares (n = 136), reportaron seguridad alimentaria; mientras que, en 2021 este porcentaje aumentó ligeramente al 22.1 % (n = 95). Se observó una disminución en la IAN leve, pasando de 16.9 % en 2019 a 8.4 % en 2021. Sin embargo, la IAN moderada mostró un incremento del 40.4 % al 49.5 %. La IAN severa se mantuvo relativamente estable. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba de χ^2, como se puede apreciar en la Tabla II.

Table I. Sociodemographic characteristics of participants in both periods.
Tabla I. Características sociodemográficas de las participantes en ambos periodos.

Variable	Periodo 2019 n = 136 % (n)	Periodo 2021 n = 104 % (n)	*p*
GMU			
Medio	74.26 (101)	75.9 (79)	0.76
Alto	25.74 (35)	24 (25)	
Estado civil			
Soltera	19.8 (27)	17.3 (18)	
Unión libre	34.5 (47)	17.3 (18)	0.006
Casada	41.9 (57)	55.8 (58)	
Separada/viuda	3.7 (5)	9.6 (10)	
Educación			
Básica	55.5 (75)	56.3 (58)	
Media	31.1 (42)	25.2 (26)	0.42
Superior	13.3 (18)	18.5 (19)	
Ocupación			
Ama de casa	68.4 (93)	67.9 (70)	
Empleada	23.5 (32)	21.5 (22)	
Cuenta propia	5.9 (8)	5.8 (6)	0.82
Estudiante	1.5 (2)	3.9 (4)	
Otro	0.7 (1)	0.9 (1)	
Nivel Socioeconómico			
Bajo	30.1 (40)	30.8 (32)	0.75
Medio	66.9 (89)	64.4 (67)	
Alto	3 (4)	4.8 (5)	

X ± σ: Media ± Desviación estándar. GMU: Grado de Marginación Urbana. Se utilizó prueba de χ^2.

Table II. Differences in food insecurity perception.
Tabla II. Diferencias en la percepción de la inseguridad alimentaria nutricional.

Nivel de seguridad alimentaria nutricional	Periodo 2019 n = 136 % (n)	Periodo 2021 n = 95 % (n)	*p*
Seguridad alimentaria	20.6 (28)	22.1 (21)	0.23
IAN leve	16.9 (23)	8.4 (8)	
IAN moderada	40.4 (55)	49.5 (47)	
IAN severa	22.1 (30)	20 (19)	

IAN: Inseguridad Alimentaria Nutricional. Se utilizó prueba de χ^2.

Variación en los Patrones de Compra de Alimentos entre 2019 y 2021

Se compararon las preferencias de los lugares de adquisición de alimentos de las participantes entre los años 2019 y 2021. En 2019 el 75.7 % de las mujeres realizaba sus compras en supermercados, cifra que experimentó una disminución al 66.4 % en 2021. Notablemente, las tiendas de conveniencia que no registraron compradores en 2019 tuvieron un incremento de 7.9 % en 2021. Las compras en tiendas de abarrotes disminuyeron de 15.4 % a 5.9 %. Las fruterías, por su parte, aumentaron su clientela del 8.8 % al 19.8 %. Los expendios de cerveza, que no tenían presencia en 2019, registraron un 1.9 % en 2021. La evaluación de las diferencias se realizó mediante la prueba de χ^2, mostrando una diferencia significativa (p = 0.001) en el lugar de compra de alimentos (Tabla III).

Estado Nutricional Después de la Pandemia de COVID-19

Los datos de la Tabla IV muestran un aumento en el IMC y la CC de las mujeres entre los dos periodos (p = 0.05; p = 0.01). Además, se aprecia una tendencia en la disminución de la ingestión de proteínas, lo cual puede señalar una alteración en las preferencias dietéticas o en la calidad de la alimentación.

Table III. Changes in households type establishments for food purchasing between 2019 and 2021.
Tabla III. Cambios en los lugares de compra de alimentos en los hogares entre 2019 y 2021.

Lugar de compra	Periodo 2019 n =136 % (n)	Periodo 2021 n =103 % (n)	*p*
Supermercados	75.7 (103)	66.4 (67)	0.001
Tiendas de conveniencia	0 (0)	7.9 (8)	
Abarrotes	15.4 (21)	5.9 (6)	
Fruterías	8.8 (12)	19.8 (20)	
Expendios de cerveza	0 (0)	1.9 (2)	

Se utilizó prueba de χ^2.

Table IV. Nutritional status of adult women in both periods.
Tabla IV. Estado nutricional de mujeres adultas en ambos periodos.

Variable	Periodo		*p*
	2019 n = 136 ($\bar{X} \pm \sigma$)	2021 n = 104 ($\bar{X} \pm \sigma$)	
Edad X ± σ (n = 136, 104)	34.4 ± 9.4	47.29 ± 15.1	0.001
IMC (kg /m^2) (n = 133, 104)	29.6 ± 6.3	30.0 ± 5.7	0.05
CC (cm) (n = 129, 103)	92.2 ± 13.6	100.6 ± 14.1	0.01
Energía total (Kcal) (n = 136, 104)	1506.9 ± 601.5	1611.1 ± 1183.6	0.42
Energía de proteínas (%) (n = 136, 103)	16.3 ± 4.2	16.0 ± 6.8	0.06
Energía de grasas (%) (n = 136, 103)	34.1 ± 10.1	36.4 ± 13.5	0.38
Energía de carbohidratos (%) (n = 136, 103)	49.5 ± 10.9	50.5 ± 20.0	0.98

X ± σ: Media ± Desviación estándar. IMC: Índice de Masa Corporal. CC: Circunferencia de cintura. Se utilizó la prueba estadística T para muestras independientes y prueba de Mann-Whitney.

Por otro lado, en el segundo periodo la edad promedio de las mujeres fue mayor significativamente en 2021 ($p = 0.001$) .

En cuanto a los niños, se comparó también el estado nutricional de los niños entre 2021 y 2019 (Tabla V). La media del puntaje Z del IMC para la edad fue de 0.3 en 2019 y 0.5 en 2021, indicando un peso saludable en ambos periodos, sin diferencias significativas. No obstante, la tabla VI muestra un aumento en la proporción de niños con sobrepeso y obesidad, pasando del 32.5 % en 2019 al 39.0 % en 2021. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se observa una tendencia preocupante hacia un mayor número de casos de sobrepeso y obesidad en 2021.

Relación entre el Estado Nutricional, Ambiente Alimentario e Ingresos

Se analizó la relación entre el estado de nutrición representado por la obesidad central (CC) de las mujeres en la muestra,

Table V. Nutritional status of children in 2019 and 2021.
Tabla V. Estado nutricional de niños en 2019 y 2021.

Variable	Periodo		*p*
	2019 n = 136 ($\bar{X} \pm \sigma$)	2021 n = 104 ($\bar{X} \pm \sigma$)	
Sexo			
Femenino (n)	25	21	
Masculino (n)	18	20	
Edad	8.4 ± 1.6	7.6 ± 1.9	0.66
Talla (cm)	129.7 ± 11.4	128.6 ± 12.7	0.68
Peso (Kg)	30.2 ± 10.3	29.91 ± 1.8	0.98
IMC/Edad (PZ*)	0.3 ± 1.4	0.58 ± 1.2	0.34

X ± σ: Media ± Desviación estándar. IMC: Índice de Masa Corporal. CC: Circunferencia de cintura. Se utilizó la prueba estadística T para muestras independientes y prueba de Mann-Whitney.

Table VI. Children's BMI classification in 2019 and 2021.
Tabla VI. Clasificación del IMC de los niños en el año 2019 y 2021.

Percentil	Periodo		*p*
	2019 n=43 % (n)	2021 n=41 % (n)	
<-2 Desnutrición aguda	4.6 (2)	2.3 (1)	0.63
-2 a +0.99 Peso adecuado	62.7 (27)	58.5 (23)	
+1 a 1.99 Sobrepeso y obesidad	32.5 (14)	39.0 (16)	

Calculado a partir de la clasificación de IMC/EDAD de la OMS. Se utilizó prueba de χ^2.

con el tipo de establecimiento en donde compraban sus alimentos y se ajustó el análisis con las variables de ingreso, ocupación, estado civil y edad de las mujeres. La Tabla VII muestra una asociación directa entre la compra en tiendas de conveniencia y un aumento en la CC de las participantes ($\beta = 9.92$, $p = 0.04$); estos valores indican que la CC de las mujeres que compran en tiendas de conveniencia fue mayor por 9.92 cm, con respecto a la compra en otros establecimientos.

En los niños se analizó la asociación entre el puntaje Z del IMC para la edad y el lugar de compra, con ajuste de las variables ingresos, ocupación y estado civil de las mujeres. La Tabla VIII indica que comprar en tiendas de conveniencia disminuye 1.39 DE el puntaje Z del IMC para la edad de los niños ($\beta = -1.39$, $p = 0.02$). Además, el aumento en los ingresos mensuales del hogar se asocia positivamente con el puntaje Z del IMC de los niños ($\beta = 0.41$, $p = 0.01$), lo que representa un aumento del puntaje Z del IMC en 0.41 DE por cada 10,000 pesos de ingreso en el hogar. Estos resultados sugieren que los patrones de compra y el nivel de ingresos son predictores importantes del estado nutricional tanto en mujeres como en niños.

Table VII. Association between food purchasing establishment and waist circumference in women (n = 95).
Tabla VII. Asociación entre el lugar de compra de alimentos y la circunferencia de cintura en mujeres (n = 95).

Variable	β	*p*	IC 95 %	
Supermercados (referencia)	-	-	-	
Tiendas de conveniencia	9.92	0.04	0.44	19.40
Abarrotes	0.78	0.89	-11.13	12.67
Fruterías	6.06	0.09	-1.07	13.20
Ingresos (x10,000 MXN)	1.22	0.31	-1.17	3.61
Sin empleo (referencia)	-	-	-	-
Con empleo	-5.15	0.08	-11.08	0.76
Edad	0.30	0.01	0.12	0.48

β = coeficiente de regresión. IC = Intervalo de Confianza al 95 %. x10,000 MXN = Cambios en el IMC por cada 10,000 MXN ganados.
Variables de ajuste: ingreso, ocupación, estado marital, edad de las participantes.

Table VIII. Association between food purchasing establishment and children's BMI Z-Score (n = 41).
Tabla VIII. Asociación entre el lugar de compra de alimentos y el puntaje Z del IMC de niños (n = 41).

Variable	β	*p*	IC 95 %	
Supermercado (referencia)	-	-	-	
Tiendas de conveniencia	-1.39	0.02	-2.61	-0.17
Abarrotes	1.06	0.35	-1.25	3.39
Frutería (Supermercados)	0.90	0.10	-0.20	2.01
Ingresos (x10,000 MXN)	0.41	0.01	0.07	0.74
Sin empleo (referencia)	-	-	-	
Con empleo	0.06	0.89	-0.91	-1.03
Educación básica (referencia)	-	-		-
Educación media	-0.30	0.51	-1.22	0.61
Educación superior	-0.68	0.18	-1.71	0.34
Sin pareja (referencia)	-	-		-
Con pareja	-0.54	0.22	-1.44	0.34

β = coeficiente de regresión. IC = Intervalo de Confianza al 95 %. x10,000 MXN = Cambios en el IMC por cada 10,000 MXN ganados.
Variables de ajuste: ingreso, ocupación, estado marital y edad de la madre

DISCUSIÓN

Entre el 2019 y 2022, el comportamiento de compra de alimentos y la dieta de la población cambió debido a diversos factores como la ubicación geográfica, la comodidad, la variedad de productos y las medidas de seguridad e higiene que se emplearon para prevenir la propagación del COVID-19 (Das *et al*., 2022; FAO, 2024). En este estudio se ha reportado como consecuencia un aumento en la IAN moderada, lo que sugiere que, aunque las familias no estén experimentando hambre severa, pueden estar enfrentando desafíos para acceder a alimentos nutritivos y suficientes. Estos hallazgos coinciden con estudios anteriores que han mostrado que la inseguridad alimentaria puede estar asociada con una dieta de baja calidad y un mayor riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (Martínez-Rojano *et al*., 2019).

El cambio en los patrones de compra de alimentos entre 2019 y 2021 refleja adaptaciones a las circunstancias cambiantes, posiblemente influenciadas por la pandemia de COVID-19. Por una parte, se encontró la disminución en la compra de alimentos en supermercados y abarrotes, mientras que la compra en fruterías aumentó. Lo anterior sugiere una preferencia por alimentos frescos y posiblemente más saludables. Sin embargo, el aumento de visitas en las tiendas de conveniencia en 2021 podría indicar una búsqueda de comodidad o una respuesta a las restricciones sanitarias (Rodríguez-Guerra *et al*., 2022; Alcántara-Hernández *et al*., 2021).

El aumento en el IMC y la CC de las mujeres entre 2019 y 2021 es alarmante. Aunque la ingestión de energía y macronutrientes no cambió significativamente, el aumento en la prevalencia de obesidad abdominal sugiere que otros factores, como la actividad física o el estrés, podrían ser relevantes. Estos hallazgos son consistentes con estudios que han mostrado un aumento en el sedentarismo y el consumo de alimentos poco saludables durante la pandemia (Gauvin *et al*., 2022).

El análisis de asociación revela relaciones complejas entre el lugar de compra, los ingresos, la ocupación y educación de las madres y el estado nutricional de las mujeres y niños. Es notable que comprar en tiendas de conveniencia esté asociado con un aumento en la CC en mujeres, pero una disminución en el puntaje Z del IMC de los niños (menor desarrollo de sobrepeso y obesidad). Distintos autores han documentado que existen factores familiares y comunitarios que protegen el estado de nutrición de los niños ante la IA de los hogares y por lo tanto en las decisiones de compra de alimentos (Bruening *et al*., 2017; Denney *et al*., 2017). Esto podría reflejar diferencias en los patrones de consumo entre mujeres y niños, en la forma en que los alimentos se distribuyen dentro del hogar o en factores comunitarios y públicos protectores (Eicher-Miller *et al*., 2023; Bruening *et al*., 2017). Según García *et al.* (2023), un aumento en la densidad de tiendas de conveniencia está positivamente asociado con el aumento en la masa corporal y la CC de mujeres adultas. Por otro lado, la relación entre el ingreso y el IMC indica que familias con mayores ingresos pueden acceder a una dieta más rica en calorías.

Existen algunos aspectos que podrían limitar la representatividad de la población en este estudio. Debido al regreso a las actividades cotidianas después de la emergencia epidemiológica a finales de 2021, la respuesta de las mujeres disminuyó en la segunda ronda de entrevistas, lo que podría afectar la comparabilidad de los grupos antes y después de la pandemia de COVID-19. Si bien los datos corresponden a AGEB seleccionadas para asegurar la representatividad de mujeres adultas en los hogares, la muestra de niños resultó un evento al azar asociado a la selección de las mujeres; ello puede afectar su representatividad en este estudio.

CONCLUSIÓN

Durante 2021 se observó que los hogares de sectores caracterizados por marginación media y alta, registraron un aumento en las compras en tiendas de conveniencia y una disminución en los abarrotes, además, las fruterías ganaron popularidad debido a precios y conveniencia, lo que reflejó la transformación del ambiente alimentario en el contexto de la pandemia de COVID-19. Este cambio de patrones de compra determinado por las afectaciones socioeconómicas de la emergencia epidemiológica, trajo como resultado un aumento en la inseguridad alimentaria nutricional moderada, consecuencias en el estado de nutrición de las mujeres y una tendencia a la protección del estado de nutrición de los niños con respecto al desarrollo de obesidad. La elección de los lugares de compra de alimentos en tiempos de confinamiento, estuvo determinada principalmente por la conveniencia en cuanto a la distancia y aforo de los establecimientos, si bien a precios más altos, lo que sugiere el consumo de alimentos poco saludables.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFRERENCIAS

Ahmed, S., Downs, S.M., Yang, C., Chunlin, L., Ten Broek, N. y Ghosh-Jerath, S. 2020. Rapid tool based on a food environment typology framework for evaluating effects of the COVID-19 pandemic on food system resilience, Food Security, 12(4), pp. 1-6.

Albarrán-Alvarado, J. C. 2020. La recesión económica y la pérdida de empleos en México a causa de las medidas de sana distancia implementadas para mitigar los contagios del nuevo coronavirus COVID-19, Realidad económica, 25(65), pp. 23-32.

Alcántara-Hernández, R.J., Islas, A.C. y Figueroa-Velázquez, J.G. 2021. Efectos de la pandemia del COVID-19 en el comportamiento del consumidor mexicano: Hábitos de compra de la canasta básica. European Scientific Journal, ESJ, 17(4), p. 165.

Asociación Mexicana de Agencias de Investigación de Mercados y Opinión Pública (AMAI). 2020. Niveles Socioeconómicos en México 2020.

Asociación Mexicana de Agencias de Investigación de Mercados y Opinión Pública (AMAI). 2022. Nota Metodológica NSE 2022, Asociación Mexicana de Agencias de Investigación de Mercado y Opinión.

Bruening, M., Lucio, J. y Brennhofer, S. 2017. Mother and adolescent eating in the context of food insecurity: findings from urban public housing. Maternal and child health journal, 21, 1911-1917.

Campos-Nonato, I., Galván-Valencia, O., Hernández-Barrera, L., Oviedo-Solís, C. y Barquera, S. 2023. Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: resultados de la Ensanut 2022, Salud Pública de México, 65(supl 1), pp. S238-S247.

Consejo Nacional de Población (CONAPO). 2017. Índice de marginación, carencias poblacionales por localidad, municipio y entidad.

Contreras-Navarro, A.L. y Ortega-Velez, M.I. 2019. Obesogenic environment case study from a food and nutrition security perspective: Hermosillo city. International Journal of Environment Research of Public Health. Jan 31;16(3):407.

Das, D., Sarkar, A. y Debroy, A. 2022. Impact of COVID-19 on changing consumer behaviour: Lessons from an emerging economy, International Journal of Consumer Studies, 46(3), pp. 692-715.

Denney, J.T., Kimbro, R.T., Heck, K. y Cubbin, C. 2017. Social cohesion and food insecurity: Insights from the Geographic Research on Wellbeing (GROW) study. Maternal and child health journal, 21, 343-350.

Eicher-Miller, H.A., Graves, L., McGowan, B., Mayfield, B.J., Connolly, B.A., Stevens, W. y Abbott, A. 2023. A scoping review of household factors contributing to dietary quality and food security in low-income households with school-age children in the United States. Advances in Nutrition (Bethesda, Md.), 14(4), pp. 914-945.

Ferrari, M.A. 2013. Estimación de la ingesta por recordatorio de 24 horas. Buenos Aires, pp. 20-5.

Food Security Information Network (FSIN). 2021. Global Report on Food Crises 2021: Joint Analysis for Better Decisions. Global Network Against Food Crises & Food Security Information Network.

García, Z., Preciado Rodríguez, J.M., Contreras, A.D., Portillo, G.E. y Ortega Vélez, M.I. 2023. Cambios en la densidad del comercio minorista de alimentos en Hermosillo, México, en el periodo del 2010 al 2021, y su asociación con la dieta, antropometría y salud de mujeres adultas, Revista Chilena de Nutrición, 50(4), pp. 433-444.

Gauvin, L., Barnett, T. A., Dea, C., Doré, I., Drouin, O., Frohlich, K.L., Henderson, M. y Sylvestre, M.P. 2022. Quarantots, quarankids, and quaranteens: how research can contribute to mitigating the deleterious impacts of the COVID-19 pandemic on health behaviours and social inequalities while achieving sustainable change, Canadian Journal of Public Health, 113(1), pp. 53-60.

Green, S.H. y Glanz, K. 2015. Development of the Perceived Nutrition Environment Measures Survey, American Journal of Preventive Medicine, 49(1), pp. 50-61.

Huesca-Reynoso, L., Llamas-Rembao, L., Jara-Tamayo, X., Vargas Tellez, C. y Rodriguez Guerrrero, D. 2021. El impacto de la pandemia del COVID-19 en la pobreza y desigualdad en México. Revista Mexicana de Economía y Finanzas Nueva Época REMEF, 16(3), e633.

Huang, T.T., Roberts, S.B., Howarth, N.C., McCrory, M.A. y Livingstone, M.B. 2006. Effect of screening out implausible energy intake reports on relationships between diet and BMI, Obesity Research, 14(10), pp. 1750-1766.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2021. Estadísticas de defunciones registradas. Comunicado de prensa Núm. 378/22.

López-Arellano, O., Bañuelos-Moreno, M., Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S. y Garrido-Latorre, F. 2024. Desigualdades socioterritoriales y defunciones por Covid-19 en la Ciudad de México, Salud Pública de México, 66. pp. 699-707.

Martínez-Rojano, H., Pérez-Escamilla, R. y Campirano-Núñez, F. 2019. Inseguridad alimentaria en México y su asociación con el estado nutricio de la población adulta: análisis de la ENSANUT 2018, Salud pública de México, 61(2), pp. 178-188.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP y WHO. 2024. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2024 – Financiamiento para poner fin al hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición en todas sus formas. Roma.

Organización Mundial de la Salud. 1995. Evaluación del crecimiento infantil: el uso e interpretación de la antropometría. Informe de un comité de expertos. Serie de informes técnicos de la Organización Mundial de la Salud, 854.

Organización Mundial de la Salud. 2020. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV).

Ortega-Velez, M.I., Bon-Padilla, K.A., Contreras-Paniagua, A.D., Portillo-Abril, G.E. y González-Valencia, D.G. 2023. Estado nutricio de niños del noroeste de México pre y post pandemia por COVID-19. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN), 73(Supl. 2), 58-64.

Quizán-Plata, T. 2006. Inseguridad alimentaria: desarrollo de un instrumento de medición basado en las experiencias de los hogares del noroeste de México. [Doctorado en ciencias, tesis]. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Rodríguez-Guerra, A.I., López-Olmedo, N., Medina, C., Hernández-Alcaraz, C., Ortega-Ávila, A.G. y Barquera, S. 2022.

Association between density of convenience and small grocery stores with diet quality in adults living in Mexico City: A cross-sectional study. Frontiers in Public Health, 10.

Romo-Avilés, M. y Ortiz-Hernández, L. 2018. Energy and nutrient supply according to food insecurity severity among Mexican households, Food Security, 10, pp. 1163-1172.

Shamah-Levy, T., Rivera-Dommarco, J., Cuevas-Nazu, L. *et al*. 2021. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Secretaría de Salud. INSP.

Universidad de California en San Francisco (UCSF). Institute of Global Health Sciences. 2021. La respuesta de México al Covid-19: Estudio de caso, pp. 2-131.

United Nations Children's Fund (UNICEF). 2021. ENCOVID-19 Infancia. Resultados mayo 2020 a octubre de 2021. UNICEF. Universidad Iberoamericana.

World Health Organization (WHO). 2024. Obesidad y sobrepeso.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Enterotoxigenic profile, biofilm production, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from rice-based food marketed in southern Mexico

Perfil enterotoxigénico, producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana de *Bacillus cereus* aislado de arroz comercializado al sur de México

Joel Reyes-Roldán[1], Mariela Cano-Ponce[1], Luis-Fernando Gaspar-Nava[1], José-Humberto Pérez-Olais[2], Salvador Muñoz-Barrios[3], Hugo-Alberto Rodríguez-Ruíz[4] and Arturo Ramírez-Peralta[1]

[1] Laboratorio de Investigación en Patometabolismo Microbiano, Universidad Autónoma de Guerrero. México.
[2] Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez. México.
[3] Laboratorio de Investigación en Inmunología y Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero. México.
[4] Laboratorio de Investigación en Biomedicina Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. México.

ABSTRACT

Bacillus cereus is responsible for food poisoning worldwide, thus, the characterization of strains isolated from food, in this case rice, is essential. Therefore, the objective of this study was to identify the toxigenic profile, lytic enzymes, antimicrobial resistance, and biofilm production of *B. cereus* strains isolated from rice. The genetic profile of toxins and biofilm-related genes of strains was determined by endpoint PCR. Biofilm was visualized by safranin staining. Evaluation of lytic enzymes was determined in culture media. Psychrophiles were monitored by the growth of the strains at refrigeration temperature. The GTG5 technique was used to determine the genetic diversity of the strains. Antimicrobial resistance of the strains was validated by minimum inhibitory concentration. The strains of *B. cereus s.l.* from rice contained genes for enterotoxins and genes associated with biofilm production. The strains did not have the cereulide gene. The strain isolated from fried rice was the only one that contained the Hbl toxin gene and the *Eps2* operon. The same strain was the only one that did not produce biofilm, had intermediate sensitivity to erythromycin, was amylase positive, had high lecithinase activity, and grew at refrigeration temperature.

Keywords: *Bacillus cereus*; rice; virulence.

RESUMEN

Bacillus cereus es responsable de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial, siendo importante la caracterización de cepas aisladas de alimentos, en este caso, de arroz. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar el perfil toxigénico, enzimas líticas, resistencia antimicrobiana y producción de biopelículas en cepas de *B. cereus* aisladas de arroz. El perfil genético de toxinas y los relacionados a biopelículas fue determinado por PCR en punto final. La biopelícula fue visualizada por tinción con safranina. La evaluación de enzimas líticas fue determinada en medios de cultivo. Los psicrófilos fueron monitoreados por crecimiento de cepas en temperatura de refrigeración. La técnica de GTG5 fue usada para determinar la diversidad genética de las cepas. La resistencia a antimicrobianos fue validada por concentración mínima inhibitoria. Las cepas de *B. cereus s.l.* de arroz contenían los genes de enteroxinas y genes asociados a producción de biopelículas. Las cepas no contienen el gen de la cereulida. La cepa aislada de arroz frito es la única que contiene el gen de la toxina Hbl y el operón *eps2*. Esta misma cepa no produce biopelícula, tiene sensibilidad intermedia a eritromicina, es amilasa positiva, tiene alta actividad lecitinolítica y crece en temperaturas de refrigeración.

Palabras clave: *Bacillus cereus;* arroz; virulencia.

INTRODUCTION

The *Bacillus cereus* group, or *B. cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*), are Gram-positive bacteria with a low GC content that belong to the Firmicutes phylum. It is a group that includes bacillus-shaped, spore-forming, aerobic to facultative anaerobic bacteria, with peritrichous flagella involved in locomotion, including at least eight highly related species: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* and *B. toyonensis* (Enosi Tuipulotu *et al*., 2021; Liu *et al*., 2015).

The species of the *B. cereus* group are endemic soil bacteria that occupy diverse ecological habitats due to the formation of endospores resistant to heat, UV radiation, acids, and desiccation, for which the bacteria can persist in a dormant state (Ehling-Schulz *et al*., 2019). In addition to spore production, *B. cereus* resists adverse environmental conditions due to the formation of biofilms on abiotic surfaces and living tissues (Duport *et al*., 2016). In this sense, it has been reported that *B. cereus* can produce biofilms in pipes and food storage systems, favoring the systematic contamination of food products (Majed *et al*., 2016; Shemesh and Ostrov, 2020; Wijman *et al*., 2007).

In addition to soil, species have been isolated from fresh and frozen foods, invertebrates, and plants (Ehling-Schulz *et al*., 2019). In this sense, it is estimated that *B. cereus* is responsible for 1.4%-12% of all food poisonings worldwide (Grutsch *et al*., 2018). *B. cereus* is responsible for two types

*Author for correspondence: Arturo Ramírez-Peralta
e-mail: ramirezperaltauagro@gmail.com
Received: August 30, 2024
Accepted: November 11, 2024
Published: December 17, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2429

of gastrointestinal syndromes. The emetic type is mainly characterized by nausea and emesis, which appears one hour after consumption of contaminated food and is clinically indistinguishable from *Staphylococcus aureus* enterotoxin poisoning (Stenfors Arnesen *et al*., 2008). The diarrheal type of food poisoning is also associated with various foods. The disease mainly manifests in diarrhea and abdominal cramps, like *Clostridium perfringes* food poisoning, and occurs after approximately 8 to 16 h after consumption (Jessberger *et al*., 2020; Stenfors Arnesen *et al*., 2008).

The diarrhoeal syndrome is associated with different enterotoxins produced after germination of spores and growth of vegetative cells, ingested through contaminated food and activated in the small intestine (Schoeni and Wong, 2005, Stenfors Arnesen *et al*., 2008). *B. cereus* produces three pore-forming enterotoxins: Nhe (a three-component non-haemolytic enterotoxin), Hbl (a three-component haemolytic enterotoxin) and, the single-component cytotoxin CytK. The emetic syndrome results from poisoning caused by a toxin called cereulide, which is found in food (Schoeni and Wong, 2005). Cereulide is a dodecapeptide composed of alpha amino and alpha hydroxy acids, structurally related to the potassium ionophore valinomycin. Cereulide is produced by a peptide synthetase called ces, which represents a new type of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) (Ehling-Schulz *et al*., 2004).

Epidemiological data show that rice, pasta, cakes, and noodles are associated with emetic syndrome, whereas vegetables, meat, and dairy products have been associated with diarrheal syndrome (Enosi Tuipulotu *et al*., 2021). In Mexico, there is currently no health legislation related to the presence of *B. cereus* in foods, but the presence of *B. cereus* in vegetables (Castulo-Arcos *et al*., 2022; Flores-Urbán *et al*., 2014), ice cream (Adame-Gomez *et al*., 2019), artisanal cheeses and eggs (Adame-Gómez *et al*., 2020b; Cruz-Facundo *et al*., 2022; 2023) has been reported. Rice is a product consumed in Mexico in different preparations, including fried rice and milk dessert with rice. In a preliminary study, *B. cereus* was isolated from 5% of rice samples, with a higher frequency in rice desserts (8.5%). However, not only the isolation of the microorganism is essential, but also the molecular characterization of different virulence factors, are needed. Therefore, the objective of this study is to identify the toxigenic profile, lytic enzymes, antimicrobial resistance, and biofilm production of *B. cereus* strains isolated from rice.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

In this study, six strains previously characterized as *B. cereus s.l.* (Cano- Ponce and Ramirez- Peralta, 2023) are included, based on the isolation and presumptive identification in MYP agar and the amplification of the *gyrB* gene as a confirmatory test (Wei *et al*., 2018). The strains are named according to unique laboratory strain codes such as B629, B630, B631, B632, B633, B634. The B629 strain was isolated from fried rice and the rest of the strains were from rice-based desserts.

Bacterial DNA extraction

For DNA extraction, 1 mL of bacterial liquid culture was centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm. The pellet was re-suspended in 200 µL of lysis solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0, and 1 mg/mL lysozyme) and incubated for 30 minutes at 37°C. Afterwards, 250 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (ratio 25:24:1) were added and homogenized by inversion. Then, it was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, 200 µL of the aqueous phase was recovered to avoid contamination with organic phase (chloroform/ phenol phase) and mixed with 1 mL of cold absolute ethanol. Finally, the solution was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was completely removed, and the DNA was resuspended in 20 µL of TE buffer (Cruz-Facundo *et al*., 2023).

Enterotoxigenic profile

Detection of the *B. cereus* toxin genes was performed by PCR using conserved regions of the *nheABC* (NA2-F AAGCI-GCTCTTCGIATTC, NB1-R ITIGTTGAAATAAGCTGTGG), *hblACD* (HD2-F GTAAATTAIGATGAICAATTTC, HA4-R AGAATAGGCATT-CATAGATT) operons, which encode non-hemolytic enterotoxins and hemolysin BL, respectively; and the genes *ces* (CesF1- GGTGACACATTATCATATAAGGTG, CesR2- GTAAGCGA-ACCTGTCTG-TAACAACA) and *cytK* (P1-cytK CAAAACTCATC-TATGCAATTATGCAT, P3-cytK ACCAGTTGTATTAA-TAACGG-CAATC), which encode for emetic toxin and cytotoxin, respectively (Ehling-Schulz *et al*., 2006; Ołtuszak-Walczak *et al*., 2006). For each PCR, the mixture contained the following: 25 µL of REDTaq DNA Polymerase Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 11 µL of sterile MiliQ water, 10 to 20 ng of genomic DNA, and 0.02 µM of each oligonucleotide. The conditions for the *nhe, hbl*, and *ces* genes were 1 cycle at 94°C for 5 minutes, 25 cycles at 94°C for 30s, 49°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and one cycle at 72°C for 5 minutes. For the *cytK* gene it was one cycle at 94°C for 2 minutes, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 1 minute, 72°C for 30 seconds, and one cycle at 72°C for 10 minutes. The *B. cereus* strains used as positive controls, were ATCC14579 for *hbl* and cytK genes, and BC133 for the *nhe* gene. The latter strain was previously isolated and characterized in the laboratory from dairy formula (Adame-Gómez *et al*., 2020a).

Determination of *B. cereus* biofilms

Biofilm determination was performed in glass and polyethylene tubes, as well as 96-well polystyrene plates. The tubes and plates were filled with 200 µL of Brain Heart Infusion (BHI) broth supplemented with 1% dextrose and inoculated with 20 µL of 24 h liquid cultures of the strains ($6x10^6$ UFC/mL). The tubes and plate were incubated at 37°C for 48 h. Later, the cultures were removed from the tubes and plates, which were then washed three times with PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH 7.2). Biofilms were stained with 200 µL of safranin for 30 min. Then, tubes and plate were washed three times with PBS 1X and distained with absolute alcohol for 10 minutes. The absorbance of the alcohol from safranin staining was determined at 550 nm (Adame-Gómez *et al*., 2020a).

Determination of genes involved in *B. cereus* biofilm formation

The genes involved in biofilm formation were amplified by endpoint PCR using the following oligonucleotides for each of the genes of interest: *sipW* (sipW- F AGATAATTAGCAACGCGATCTC, sipW-R AGAAATAGCGGAATAACCAAGC), tasA (tasA-F AGCAGCTTTAGTTGGTGGAG, tasA- R GTAACTTATCGCCTTGGAATTG), *calY* (calY-F AGGTATCGGGAGTTCATCAG, calY R CAGCTTCTTGGTTGGCATTG), and *eps2* (eps2-F TGTTTTGAGCGGATTTGTTTTGT, eps2-R GATTGCTCTGCCAATGTCTTT) (Caro-Astorga *et al*., 2014; 2020). For each PCR, the mixture contained the following: 25 µL of REDTaq DNA Polymerase Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 11 µL of sterile MiliQ water, 10 to 20 ng of genomic DNA, and 0.02 µM of each oligonucleotide. The conditions for the *sipW*, *tasA*, and *calY* genes were 1 cycle at 94°C for 5 minutes, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 61°C for 45 seconds, 72°C for 45 seconds, and a cycle of 72°C for 5 minutes. For the *eps2* operon, it was one cycle at 94°C for 2 minutes, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 30 seconds, 72°C for 90 seconds, and one cycle at 72°C for 10 minutes. The *B. cereus* ATCC14579 strain was used as a positive control (Cruz-Facundo *et al*., 2023).

Determination of *B. cereus* extracellular enzymes and growth at low temperatures

The determination of extracellular enzymes was carried out by inoculating 2 µL of a 24-h culture on different agar plates: BHI with 1% starch agar, 5% casein agar, 5% gelose blood agar, and 10% MYP agar of egg yolk emulsion. The agar plates were incubated at 30°C for 24 h, and the 5% blood agar plates were incubated at 10°C for 10 days. After incubation, 30 µL of lugol were added to demonstrate amylolytic activity on 1% starch agar. For proteolytic and lecitinolytic activity, the presence or absence of hydrolysis zones was observed in 5% casein agar and 10% egg yolk emulsion agar (Claus and Berkeley, 1986). To estimate the lecithinase activity, the ratio was estimated by zone diameter of colony, and zone diameter of halo. In the case of psychotropic capacity, growth/non-growth at 10°C of the strains was monitored for ten days by visual observation, considering the day on which growth was observed as the detection time (DT) (Berthold-Pluta *et al*., 2019; Cruz-Facundo *et al*., 2023).

Genetic diversity of *B. cereus*

The phylogenetic relationship between the strains of the *B. cereus* group was determined using the repetitive palindromic element PCR technique (rep-PCR) using GTG^5 primers (GTGGTGGTGGTGGTG) with the following reaction conditions: initial denaturation at 95°C for 2 minutes, 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 40°C for 2 minutes, 72°C for 4 minutes and a final extension of 72°C for 5 minutes (De Jonghe *et al*., 2008). Electrophoresis was performed in 2% agarose gels at 90V for 120 minutes. The gels were stained with Midori Green (Nippon Genetics, Germany) and visualized with LED light.

The DICE similarity coefficient was calculated to establish the genetic distances of the profiles. The genetic distance matrix was analyzed by the UPGMA method. A dendrogram was made with the analyzed data using NTSYS 2.0 software.

Antimicrobial resistance in *B. cereus*

Broth microdilution testing was performed for each strain using Mueller-Hinton, broth in accordance with CLSI guideline M45: ED3 (Hindler and Richter, 2016) . A total of ten antibiotics (Oxoid, UK) were tested: ampicillin (0.12 - 16 µg/mL), ciprofloxacin (0.5 - 4 µg/mL), clindamycin (0.2 - 4 µg/mL), gentamicin (2 -500 µg/mL), tetracycline (2-16 µg/mL), trimethoprim (0.5 - 9.5 µg/mL), kanamycin (2-500 µg/mL), vancomycin (1-64 µg/mL), erythromycin (0.5 - 8 µg/mL) and chloramphenicol (0.5 - 32 µg/mL). The *B. cereus s.l.* inoculum was prepared from a 24 h culture by first adjusting the culture concentration to 0.5 McFarland of the standard turbidity scale (1×10^8 CFU/mL). The final inoculum concentration in the microplate was 5×10^5 CFU/mL. Each plate included a positive control (MH broth with inoculum without antibiotic) and a negative control (MH broth without inoculum with antibiotic). The microplates were incubated at 30°C for 24 h. Ten µL of a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution were added to verify growth and incubated for 30 min at 30°C in the dark. Formazan production indicated the presence of viable cells.

RESULTS AND DISCUSSION

In Mexico, the annual per capita consumption of rice is 8.5 kg, considered the second crop with the highest expenditure among mexican families (SAGARPA, 2017). However, *B. cereus*, a pathogen associated with foodborne diseases worldwide, has been isolated in rice (Dietrich *et al*., 2021; Enosi Tuipulotu *et al*., 2021). Rice and its derivatives serve as an ideal growth medium for bacteria, particularly *B. cereus*, due to their compositional and chemical characteristics (pH close to 7, approximately 79% carbohydrates, 7% protein, and 2% fat). These properties, combined with the resilience of *B. cereus* spores, which can survive in dehydrated grains and withstand the temperatures typically applied during processing, enable the bacterium to proliferate under a variety of conditions (Jaquette and Beuchat, 1998). Therefore, in this study, strains of *B. cereus s.l.* were characterized and isolated from different rice-based preparations.

In the different studies of *B. cereus* in rice, strains with the same toxigenic profiles have not been isolated, and even the frequencies change depending on the type of rice and country (Ankolekar *et al*., 2009; Kim *et al*., 2009; 2014; Park *et al*., 2009), which is why studying the diversity of *B. cereus* strains in Mexico is essential. A total of six strains of the *B. cereus* s.l. group previously isolated from rice were characterized. All these strains were positive for the non-hemolytic toxin gene (*nhe*) and negative for the cereulide toxin gene (*ces*). Only one strain (B629) was positive for the hemolytic toxin BL gene (*hbl*) and negative for the cytotoxin K gene (*cytK*) (Table 1) (Figure 1).

In this study, a remarkable occurrence of the non-hemolytic toxin gene (*nheABC*) with a 100% frequency was

Table 1. Toxin-coding genes identified in the *B. cereus s.l.* strains from this study.
Tabla 1. Genes de las toxinas identificadas en las cepas de *B. cereus s.l.* de este estudio.

Strain	*hbl*	*nhe*	*cytK*	*ces*
B629	+	+	-	-
B630	-	+	+	-
B631	-	+	+	-
B632	-	+	+	-
B633	-	+	+	-
B634	-	+	+	-

identified in the analyzed strains. Globally, non-hemolytic toxin genes are frequently reported, often reaching values of up to 100%. In Mexico, several food products, including cheese, ice cream, eggs, and vegetables, have shown a high prevalence of non-hemolytic toxin genes (Adame-Gomez *et al*., 2019; 2020b; Castulo-Arcos *et al*., 2022; Cruz-Facundo *et al*., 2022; 2023); it is important to note that these findings do not exclude the possibility that these strains are circulating in rice, in which, the frequency of non-hemolytic toxin genes show a range from 47.3% to 100%. The variability in these results is suggested to be related to the specific type of rice analyzed. For example, in ready-to-eat rice-based foods, a frequency of 47.3% was observed (Chen *et al*., 2022) while frequencies approaching 100% were identified in different types of rice, including white rice, brown rice, black rice, hard rice, and glutinous rice (Ankolekar *et al*., 2009; Kim *et al*., 2009; 2014; Park *et al*., 2009).

The frequencies of Hbl toxin genes were low (16.6%) compared to the global reported frequencies for these toxin genes (40-70%) (Jessberger *et al*., 2020). As for Mexico, the frequencies are low (Adame-Gomez *et al*., 2019; 2020b; Castulo-Arcos *et al*., 2022; Cruz-Facundo *et al*., 2022; 2023) as in this study, which does not rule out a regional circulation of *B. cereus* strains in different food products. Regarding rice, the reported frequencies of Hbl toxin genes are high compared to this study. The lowest frequencies for the Hbl toxin are found in strains isolated from rice-based ready-to-eat foods (36.3 %), and the highest frequencies are found in white and brown rice (83-100%) in China and Korea. In the United States, even when it was isolated from white and brown rice, the frequency of the Hbl toxin was low (56.6%), so it is not surprising that not only the type of product, but also the geographic region, is important in the frequency of enterotoxins. In this sense, the regionalization of diarrheal and emetic syndromes with the dietary habits of each country has even been described (Enosi Tuipulotu *et al*., 2021; Kotiranta *et al*., 2000).

Another virulence factor, in addition to spore formation and toxin production by *B. cereus*, is the ability to form biofilms. Biofilms are bacterial communities that, in the case of *B. cereus*, have been described in food production areas, becoming a problem because, on one hand, they favor systematic contamination of food. On the other hand, the formation of biofilms prevents the eradication of the microorganisms trapped in it due to the characteristics of resistance to disinfectant agents (Majed *et al*., 2016).

Regarding biofilm formation, strains B631, B632, B633, and B634 exhibit substantial biofilm production on glass material in contrast to strain B629 ($p = 0.0211$, $p = 0.0445$, $p = 0.0211$, $p = 0.0216$). Notably, three strains (B632, B633, B634) show the ability to form biofilms on polystyrene. It is noteworthy that none of the strains form biofilms on polyethylene as shown in Figure 2.

In this investigation, prolific biofilm production was observed exclusively on glass material, in contrast to minimal production on polyethylene and, to a lesser extent, polystyrene. The variation in biofilm production on different materials is consistent with previous literature which attribute such differences to the hydrophobic properties and

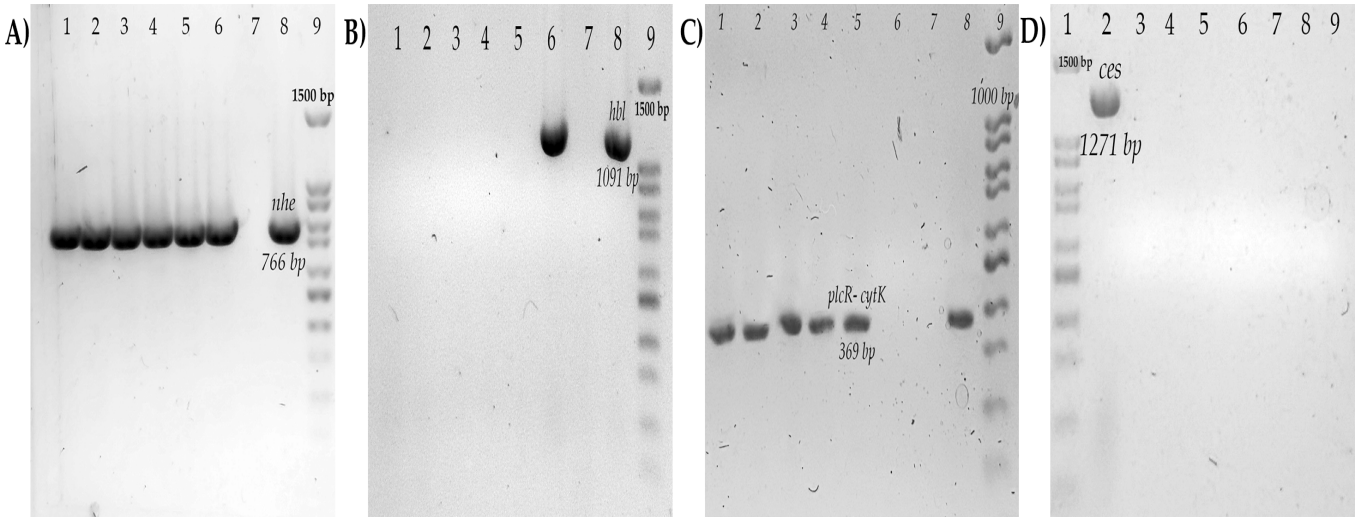


Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products from toxin profile of *B. cereus s.l.* A) *nheABC*, B) *hblABD*, C) *plcr- cytK*. D) *ces*. Lane 1. B634, Lane 2. B633, Lane 3. B632, Lane 4. B631, Lane 5. B630, Lane 6. B629, Lane 7. Negative control, Lane 8. Positive control *B. cereus* ATCC 14579 (*hbl*+, *plcr- cytK*+).
Figura 1. Electroforesis en gel de los productos de PCR del perfil de toxinas de *B. cereus s.l.* A) *nheABC*, B) *hblABD*, C) *plcr- cytK*. D) *ces*. Carril 1. B634, Carril 2. B633, Carril 3. B632, Carril 4. B631, Carril 5. B630, Carril 6. B629, Carril 7. Control negativo, Carril 8. Control positivo *B. cereus* ATCC 14579 (*hbl*+, *plcr- cytK*+).

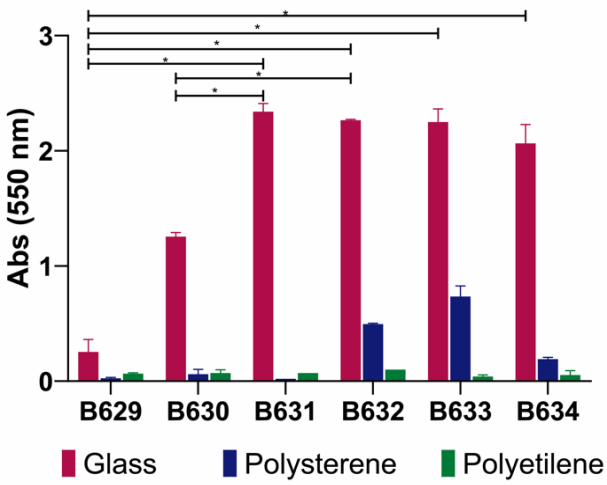


Figure 2. Biofilm production of *B. cereus s.l.* strains in different materials to 37°C for 48h. Safranin absorbance data from two independent assays are shown, represented as mean and standard deviation. The p values were calculated from the ANOVA statistical test with Tukey posthoc.
Figura 2. Producción de biofilm de las cepas de *B. cereus s.l.* en diferentes materiales a 37°C por 48h. Se muestran los datos de absorbancia de safranina de dos ensayos diferentes, representados como media y desviación estándar. El valor de p fue calculado por la prueba estadística de ANOVA con posthoc de Tukey.

surface roughness of the materials(Adame-Gómez *et al*., 2020a; De-la-Pinta *et al*., 2019). In addition, the presence of trace elements, particularly iron, has been implicated in biofilm production. Hayrapetyan *et al*. (2015) reported increased biofilm production on stainless steel, attributed to iron ions, compared to polystyrene. Within our research group, previous studies have indicated higher biofilm production on PVC compared to other materials (Adame-Gómez *et al*., 2020a; Cruz-Facundo *et al*., 2022). It's worth noting that discrepancies between our results and those of this study may be related to the different origins of the strains. Hayrapetyan *et al*. (2016) relate the origin of the isolation to the adaptation capacity of the strains to environments with different iron conditions.

Regarding the genes related to biofilm production, only strain B629 has the *eps2* operon. All strains have the *sipW-tasA-calY* operon genes (Figure 3). In *B. cereus*, the participation of different genes in the production of biofilms has been described; these genes are grouped in the *sipW-tasA-calY* and *eps2* operons (Caro-Astorga *et al*., 2014; 2020). SipW is a peptidase that participates in the maturation of the tasA protein, which functions in the formation of amyloid-type fibers, which are part of a mature biofilm (Caro-Astorga *et al*., 2014). CalY fulfills a dual function during biofilm production, participating as an adhesin on glass but not polystyrene in the early stages of biofilm formation and forming fibers during the late phases (Candela *et al*., 2019). *Eps2* is an operon that include genes related to the extracellular matrix, the main component of biofilms (Caro-Astorga *et al*., 2020). The diverse functions these proteins fulfill explain why most of the strains in this study produce abundant biofilms on glass, except for strain B629, which, despite having all the genes related to biofilms, visually produces a biofilm that easily detaches from the air-liquid interface and therefore is not evident by safranin staining. Dogsa *et al*. (2013) showed that the width of the biofilm is related to the culture medium and to the presence of the *tasA* and *epsA* genes. The absence of one of these genes drastically reduces the thickness of the biofilm, and in the absence of both, the strain does not produce a biofilm. For B629, the production of a thin biofilm could be explained by presence of a non-functional *tasA* gene, which is reflected in a thin biofilm that easily detaches from the tube. Despite the detailed information about the participation of

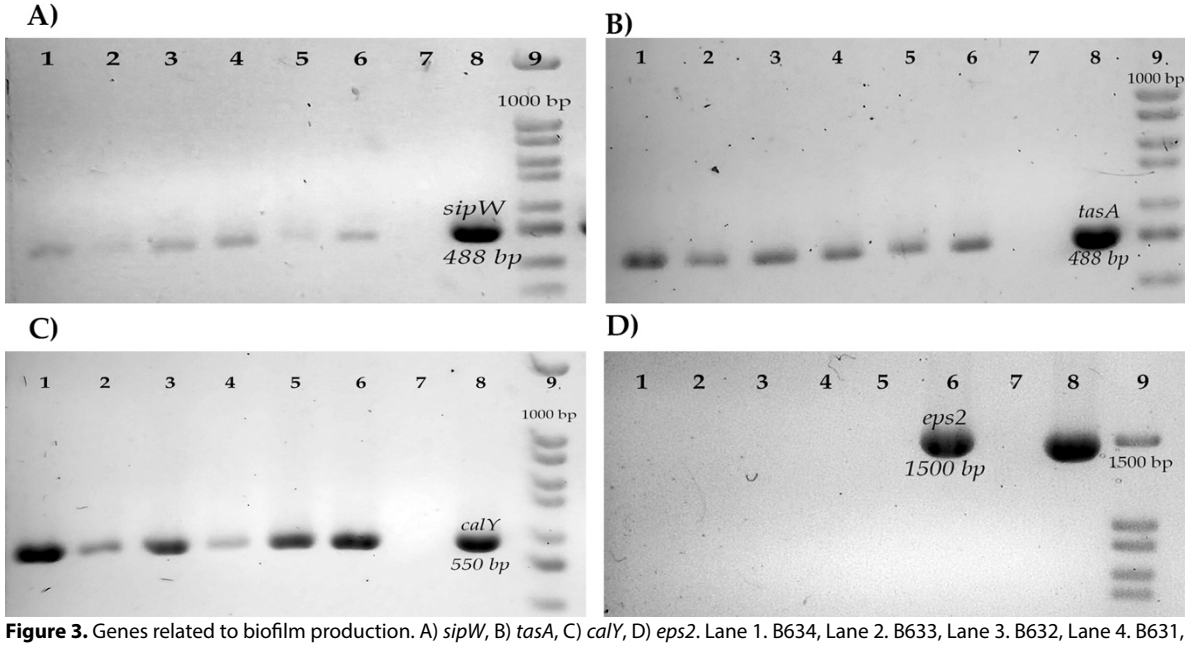


Figure 3. Genes related to biofilm production. A) *sipW*, B) *tasA*, C) *calY*, D) *eps2*. Lane 1. B634, Lane 2. B633, Lane 3. B632, Lane 4. B631, Lane 5. B630, Lane 6. B629, Lane 7. Negative control, Lane 8. Positive *B. cereus* ATCC 14579 control.
Figura 3. Genes relacionados a la producción de biopelículas. A) *sipW*, B) *tasA*, C) *calY*, D) *eps2*. Carril 1. B634, Carril 2. B633, Carril 3. B632, Carril 4. B631, Carril 5. B630, Carril 6. B629, Carril 7. Control negativo, Carril 8. Control positivo *B. cereus* ATCC 14579.

the *sipW-tasA-calY* and *eps2* operons in biofilm production (Caro-Astorga *et al*., 2020; 2014), few epidemiological studies include them in molecular characterization (Cruz-Facundo *et al*., 2023). Since biofilm production is part of the resistance mechanisms and systematic contamination of food products (Enosi Tuipulotu *et al*., 2021), not only enterotoxigenic and enzymatic profiles should be considered, but also those genetic profiles associated with biofilm production, which are included in this study.

B. cereus not only produces enterotoxins, but also a significant number of extracellular enzymes with degradative activity, such as phospholipases, proteases, chitinases, and amylases (Ivanova *et al*., 2003). This enzymatic profile is related to the ability of *B. cereus* to spoilage food and as a nutrient assimilation mechanism (Arslan *et al*., 2014). In this sense, the B629 strain is the only amylolytic strain in the study, and coincides with being the only strain isolated from fried rice. Strains isolated from sweet rice are capable of producing proteases, which can have a significant impact on the decomposition of the product, since it has been described that proteases are capable of gelatinizing milk (Chen *et al*., 2003). All strains produce proteases and strains in different proportions produce lecithinase. Only one strain can grow at refrigeration temperatures (B629) (Table 2). In this sense, strains of *B. cereus* are divided into two groups: psychotrophic and mesophilic. In this study, it is reported that strain B629 is a psychotrophic strain capable of growing in 5 days at a temperature of 10°C, and that the other strains, since they cannot grow at refrigeration temperatures, could be considered mesophilic strains. The presence of psychrotrophic strains, such as B629, impact the food safety of food products that are preserved in the cold, including rice.

Table 2. Lytic enzymes and cold tolerance of *B. cereus s.l.* strains.
Tabla 2. Enzimas líticas y tolerancia al frío de las cepas de *B. cereus s.l.*

Strain	*Amylase*	*Protease*	*Lecithinase*	Growth in low temperatures (DT)
B629	+	+	0.71	5
B630	-	+	0.52	-
B631	-	+	0.60	-
B632	-	+	0.50	-
B633	-	+	0.50	-
B634	-	+	0.60	-

Detection time (DT): the day on which growth was observed
Tiempo de detección (DT): El día en donde se observa crecimiento

Genetic diversity techniques, such as GTG'5, have allowed strains to be grouped according to different characteristics, including growth temperature. Regarding the genetic diversity of the *B. cereus s.l.* group, strains were grouped into three clusters. In the first cluster, two clones were identified; the first clone includes strain B629 isolated from fried rice, the only strain that grows at refrigeration temperatures and is amylase positive, and is also the only one positive for the toxin BL gene (*hbl*); the second clone includes strains B632 and B633, which share most of the characteristics with the clones belonging to the other clusters (Figure 4).

The GTG'5 technique allowed the identification of two clones, one with tolerance to refrigeration temperatures, amylolytic, not a biofilm producer, and isolated from fried rice. Furthermore, the technique allowed us to separate this clone from three remaining clones isolated from sweet rice with similar genotypic characteristics, including the profile of toxins and genes associated with biofilm production. This is evidence that the strains circulating in fried rice are different from the strains found in sweet rice, which allows us to estimate that the risk of poisoning also depends on the product consumed. For example, emetic strains have been linked to the consumption of products such as pasta and rice, while the consumption of meat and vegetables has been linked to enterotoxigenic strains (Enosi Tuipulotu *et al*., 2021).

Regarding antimicrobial resistance, it was found that all strains are resistant to penicillin, ceftriaxone, clindamycin, and trimethoprim. The strains were susceptible to kanamycin,

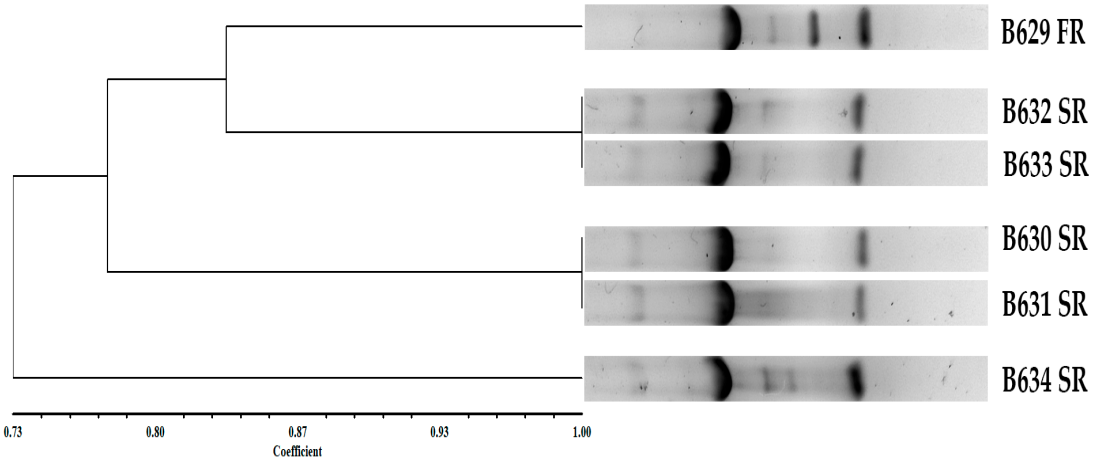


Figure 4. Dendrogram obtained by GTG-5' of *B. cereus s.l.* strains. Six *gyrB*-positive rice strains were grouped, three clusters and four clones. The DICE test was used, and the strains were grouped by hierarchical cluster. A DICE coefficient >0.8 was used to cluster the strains. FR: Fried rice. SR: Sweet rice.
Figura 4. Dendrograma obtenido por GTG-5' de las cepas de *B. cereus s.l.* Se agruparon seis cepas positivas para *gyrB*, tres grupos y cuatro clones. Se utilizó la prueba DICE y las cepas fueron agrupados por grupo jerárquico. Un coeficiente DICE >0.8 fue usado para agrupar las cepas. FR: Arroz frito. SR: Arroz dulce.

gentamicin, vancomycin, tetracycline, chloramphenicol, and ciprofloxacin. It is important to note that only B629 has intermediate sensitivity to erythromycin (Table 3).

Regarding antibiotic resistance, strains of *B. cereus s.l.* from this study were resistant to beta-lactams, which has been reported in other studies (Chen *et al*., 2022; Fraccalvieri *et al*., 2022; Park *et al*., 2009; Perera and Ranasinghe, 2012). Fraccalvieri *et al*. (2022) demonstrated that the main mechanism of resistance to beta-lactams is mediated by the beta-lactamases BLA-1 and BLA-2, since all their beta-lactam resistant strains presented these genes. In addition to resistance to beta-lactams, high resistance to trimethoprim has also been reported in other studies in strains of *B. cereus s.l.* isolated from rice and cheese (Chen *et al*., 2022; Cruz-Facundo *et al*., 2023). It is important to mention the reports related to the high susceptibility to different groups of antimicrobials such as aminoglycosides, glycopeptides, tetracyclines, and phenicol's (Chen *et al*., 2022; Cruz-Facundo *et al*., 2023; Park *et al*., 2009) which is also consistent with what was reported in these strains. However, the presence of a strain with intermediate sensitivity to erythromycin in this study (B629) should not be underestimated.

Table 3. Antimicrobial resistance of *B. cereus s.l.* strains from rice.
Tabla 3. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *B. cereus s.l.* obtenidas de arroz.

Antibiotic	Sensible (≤ 2μg/ mL)	Intermediate (>2- <16 μg/ mL)	Resistant (≥ 16 μg/ mL)
Penicillin			6 (100%)
Ceftriaxone			6 (100%)
Erythromycin	5 (83.4%)	1 (16.6%)	
Clindamycin			6 (100%)
Ciprofloxacin	6 (100%)		
Tetracycline	6 (100%)		
Chloramphenicol	6 (100%)		
Vancomycin	6 (100%)		
Gentamycin	6 (100%)		
Kanamycin	6 (100%)		
Trimethoprim			6 (100%)

CONCLUSIONS

The *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*) strains isolated from rice exhibit enterotoxigenic profiles, indicating their potential to cause food poisoning. Of particular note is the finding that strains isolated from sweet rice have a propensity to form biofilms on glass, and exhibit a distinct enterotoxigenic profile compared to the strain isolated from fried rice. The unique characteristics identified in the strain isolated from fried rice underscore the importance of further investigation and warrant an expansion of the sample size, specifically within this rice type. This expansion aims to systematically explore the presence of strains with similar metabolic and virulence characteristics.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the General Directorate of Postgraduate and Research of the Universidad Autónoma of Guerrero, particularly to PhD. Berenice Illades Aguiar for promoting the summers of scientific research and facilitating the incorporation of Mariela Cano Ponce to the laboratory. Luis Daniel Sánchez Arcos for graphical abstract author.

CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper

REFERENCES

Adame-Gomez, R., Castro Alarcón, N., Vences-Velázquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago-Dionisio, M.C. and Ramírez-Peralta, A. 2019. Prevalencia de cepas del grupo de *Bacillus cereus* productoras de biopelicula en helados comercializados en México. https://doi.org/10.5281/ZENODO.3520530

Adame-Gómez, R., Cruz-Facundo, I.-M., García-Díaz, L.-L., Ramírez-Sandoval, Y., Pérez-Valdespino, A., Ortuño-Pineda, C., Santiago-Dionisio, M.-C. and Ramírez-Peralta, A. 2020a. Biofilm production by enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* in different materials and under different environmental conditions. Microorganisms 8, 1071. https://doi.org/10.3390/microorganisms8071071

Adame-Gómez, R., Muñoz-Barrios, S., Castro-Alarcón, N., Leyva-Vázquez, M.-A., Toribio-Jiménez, J. and Ramírez-Peralta, A., 2020b. Prevalence of the strains of *Bacillus cereus* Group in artisanal mexican cheese. Foodborne Pathog. Dis. 17, 8-14. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2673

Ankolekar, C., Rahmati, T. and Labbé, R.G. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. Int. J. Food Microbiol. 128, 460-466. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.006

Arslan, S., Eyi, A. and Küçüksarı, R. 2014. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. Anaerobe 25, 42-46. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.006

Berthold-Pluta, A., Pluta A., Garbowska, N. and Stefańska, I. 2019. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. Foods 8, 269. https://doi.org/10.3390/foods8070269

Candela, T., Fagerlund, A., Buisson, C., Gilois, N., Kolstø, A.-B., Økstad, O.A., Aymerich, S., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D. and Gohar, M. 2019. CalY is a major virulence factor and a biofilm matrix protein. Mol. Microbiol. 111, 1416-1429. https://doi.org/10.1111/mmi.14184

Cano-Ponce, M. and Ramirez- Peralta, A., 2023. Aislamiento de *B. cereus* en arroz comercializado en el sur de México. Tlamati Press.

Caro-Astorga, J., Álvarez-Mena, A., Hierrezuelo, J., Guadix, J.A., Heredia-Ponce, Z., Arboleda-Estudillo, Y., González-Munoz, E., de Vicente, A. and Romero, D. 2020. Two genomic regions encoding exopolysaccharide production systems have complementary functions in *B. cereus* multicellularity and host interaction. Sci. Rep. 10, 1000. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57970-3

Caro-Astorga, J., Pérez-García, A., de Vicente, A. and Romero, D., 2014. A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. Front. Microbiol. 5, 745. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00745

Castulo-Arcos, D.A., Adame-Gómez, R., Castro-Alarcón, N., Galán-Luciano, A., Santiago Dionisio, M.C., Leyva-Vázquez, M.A., Perez-Olais, J.-H., Toribio-Jiménez, J. and Ramirez-Peralta, A. 2022. Genetic diversity of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains in coriander in southwestern Mexico. PeerJ 10, e13667. https://doi.org/10.7717/peerj.13667

Chen, J., Zhang, J., Zhan, L., Chen, H., Zhang, Z., Huang, C. and Yue, M. 2022. Prevalence and antimicrobial-resistant characterization of *Bacillus cereus* isolated from ready-to-eat rice products in Eastern China. Front. Microbiol. 13, 964823. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.964823

Chen, L., Daniel, R.M. and Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. Int. Dairy J. 13, 255-275. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00171-1

Claus, D. and Berkeley, C. 1986. The genus *Bacillus*, in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp. 1105-1139.

Cruz-Facundo, I., Adame-Gómez, R., Vences-Velázquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Muñoz-Barrios, S., Pérez-Oláis, J. and Ramírez-Peralta, A. 2022. *Bacillus cereus* in eggshell: Enterotoxigenic profiles and biofilm production. Braz. J. Poult. Sci. 24, eRBCA-2021-1535. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1535

Cruz-Facundo, I.-M., Toribio-Jiménez, J., Castro-Alarcón, N., Leyva-Vázquez, M.-A., Rodríguez-Ruíz, H.-A., Pérez-Olais, J.-H., Adame-Gómez, R., Rodríguez-Bataz, E., Reyes-Roldán, J., Muñoz-Barrios, S. and Ramírez-Peralta, A. 2023. *Bacillus cereus* in the artisanal cheese production chain in southwestern Mexico. Microorganisms 11, 1290. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051290

De Jonghe, V., Coorevits, A., Vandroemme, J., Heyrman, J., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2008. Intraspecific genotypic diversity of *Bacillus* species from raw milk. Int. Dairy J. 18, 496-505. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.007

De-la-Pinta, I., Cobos, M., Ibarretxe, J., Montoya, E., Eraso, E., Guraya, T. and Quindós, G. 2019. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. J. Mater. Sci. Mater. Med. 30, 77. https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3

Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E. and Granum, P.E. 2021. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. Toxins 13, 98. https://doi.org/10.3390/toxins13020098

Dogsa, I., Brloznik, M., Stopar, D. and Mandic-Mulec, I. 2013. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. PloS One 8, e62044. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062044

Duport, C., Jobin, M. and Schmitt, P. 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550

Ehling-Schulz, M., Fricker, M. and Scherer, S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Mol. Nutr. Food Res. 48, 479-487. https://doi.org/10.1002/mnfr.200400055

Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M. and Svensson, B. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 260, 232-240. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. and Koehler, T.M. 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. Microbiol. Spectr. 7, 7.3.6. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018

Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C. and Man, S.M. 2021. *Bacillus cereus*: Epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions. Trends Microbiol. 29, 458-471. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003

Flores-Urbán, K.A., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Quiñones, C.R., Vázquez-Salinas, C. and Quiñones-Ramírez, E.I. 2014. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* strains isolated from vegetables in Mexico City. J. Food Prot. 77, 2144-2147. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-479

Fraccalvieri, R., Bianco, A., Difato, L.M., Capozzi, L., Del Sambro, L., Simone, D., Catanzariti, R., Caruso, M., Galante, D., Normanno, G., Palazzo, L., Tempesta, M. and Parisi, A. 2022. Toxigenic genes, Pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group isolated from ice cream and characterized by whole genome sequencing. Foods Basel Switz. 11, 2480. https://doi.org/10.3390/foods11162480

Grutsch, A.A., Nimmer, P.S., Pittsley, R.H., Kornilow, K.G. and McKillip, J.L. 2018. Molecular pathogenesis of *Bacillus* spp., with emphasis on the dairy industry. Fine Focus 4, 203-222. https://doi.org/10.33043/FF.4.2.203-222

Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T. and Nierop Groot, M. 2015. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. Int. J. Food Microbiol. 200, 72-79. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.005

Hayrapetyan, H., Siezen, R., Abee, T. and Nierop Groot, M. 2016. Comparative genomics of iron-transporting systems in *Bacillus cereus* strains and impact of iron sources on growth and biofilm formation. Front. Microbiol. 7, 842. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00842

Hindler, J.A. and Richter, S.S., 2016. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: M45, 3rd edition. ed, Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S.D., Overbeek, R. and Kyrpides, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature 423, 87-91. https://doi.org/10.1038/nature01582

Jaquette, C.B. and Beuchat, L.R. 1998. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. Journal of food protection, 61(12), 1629-1635. https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.12.1629

Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P.E. and Märtlbauer, E. 2020. The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. Toxins 12, 701. https://doi.org/10.3390/toxins12110701

Kim, B., Bang, J., Kim, H., Kim, Y., Kim, Byeong-sam, Beuchat, L.R. and Ryu, J.-H. 2014. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: Prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. Food Microbiol. 42, 89-94. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.021

Kim, S.K., Kim, K.-P., Jang, S.S., Shin, E.M., Kim, M.-J., Oh, S. and Ryu, S. 2009. Prevalence and toxigenic profiles of *Bacillus cereus*

isolated from dried red peppers, rice, and sunsik in Korea. J. Food Prot. 72, 578-582. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.3.578

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect. 2, 189-198. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00269-0

Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L. and Shao, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. Sci. Rep. 5, 14082. https://doi.org/10.1038/srep14082

Majed, R., Faille, C., Kallassy, M. and Gohar, M. 2016. *Bacillus cereus* biofilms-same, only different. Front. Microbiol. 7, 1054. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054

Ołtuszak-Walczak, E., Walczak, P. and Modrak, R. 2006. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* producing hemolytic and non hemolytic enterotoxins by PCR test. Pol. J. Microbiol. 55, 113-118.

Park, Y.-B., Kim, J.-B., Shin, S.-W., Kim, J.-C., Cho, S.-H., Lee, B.-K., Ahn, J., Kim, J.-M. and Oh, D.-H. 2009. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. J. Food Prot. 72, 612-617. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.3.612

Perera, M.L. and Ranasinghe, G.R. 2012. Prevalence of *Bacillus cereus* and associated risk factors in chinese-style fried rice available in the city of Colombo, Sri Lanka. Foodborne Pathog. Dis. 9, 125-131. https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0969

SAGARPA. 2017. Arroz Mexicano. (Federal), Planeacion agricola nacional 2017. 2030. SAGARPA, Ciudad de Mexico.

Schoeni, J.L. and Wong, A.C.L. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68, 636-648. https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.3.636

Shemesh, M. and Ostrov, I. 2020. Role of *Bacillus* species in biofilm persistence and emerging antibiofilm strategies in the dairy industry. J. Sci. Food Agric. 100, 2327-2336. https://doi.org/10.1002/jsfa.10285

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. and Granum, P.E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Rev. 32, 579-606. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x

Wei, S., Chelliah, R., Park, B.-J., Park, J.-H., Forghani, F., Park, Y.-S., Cho, M.-S., Park, D.-S. and Oh, D.-H. 2018. Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimbap) using quantitative real-time PCR targeting groEL and gyrB. Microb. Pathog. 115, 312–320. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.079

Wijman, J.G.E., de Leeuw, P.P.L.A., Moezelaar, R., Zwietering, M.H. and Abee, T. 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1481-1488. https://doi.org/10.1128/AEM.01781-06

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Elementos genómicos asociados a la formación de biopelículas en *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie lactis

Genomic elements associated with biofilm formation in *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies lactis

Cesar Onoshi Sedano-Juaréz[1], Joivier Vichi-Lozada[2], Rodolfo Lagunes-Quintanilla[3], Raúl Dávila-Delgado[4] y América Ivette Barrera-Molina[4]*

[1] Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3004, Copilco Universidad, Coyoacán, Ciudad de México.
[2] Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal, 62574, Jiutepec Mor.
[3] Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI).
[4] Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición, Calle Ixtaccíhuatl 100, Vista Hermosa, 62350 Cuernavaca, Mor.

ABSTRACT

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus and L. delbrueckii* subsp. *lactis* are two biotechnologically important subspecies within the group of lactic acid bacteria. Both are used to obtain products based on lactic fermentation and their activity as probiotics has been reported. The aim of the present study was to identify and compare the genomic elements associated with biofilm formation in both subspecies using computational tools. The bibliometric analysis showed that adhesin genes, exopolysaccharide synthesis genes, and *cis*- and *trans*-regulatory elements could be associated with biofilm formation in both subspecies. The comparison of 12 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and seven *L. delbrueckii* subsp. *lactis* genomes, detected the presence of the *pili* and *srtA* genes in a conserved operon with identity percentages greater than 97 % between both subspecies. The *inu* gene that has a levansucrase function was also identified. Finally, the *epsD* gene was found present in a polycistronic transcriptional unit, encoding an enzyme associated with the synthesis of heteropolysaccharides. These data show, for the first time, evidence of the presence of genes that participate in biofilm formation in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains.

Keywords: *pili* gene; *srtA* gene; *inu* gene, *epsD* gene, bioinformatic.

RESUMEN

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* son dos subespecies biotecnológicamente importantes dentro del grupo de bacterias ácido-lácticas. Ambas se emplean en la obtención de productos basados en fermentación láctica y se ha reportado su actividad como probióticos. El objetivo del presente estudio fue identificar y comparar los elementos genómicos asociados a la formación de biopelículas en ambas subespecies utilizando herramientas computacionales. El análisis bibliométrico mostró que los genes de adhesinas, de síntesis de exopolisacáridos y elementos reguladores tipo *cis* y *trans* podrían estar asociados a la formación de biopelículas en ambas subespecies. La comparación de 12 genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y 7 de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* detectaron la presencia de los genes *pili* y *srtA* en un operón conservado con porcentajes de identidad superiores al 97 %. También se identificó el gen *inu* que presenta función de levansucarasa. Finalmente se encontró el gen *epsD*, presente en una unidad transcripcional policistrónica, que codifica para una enzima asociada a la síntesis de heteropolisacáridos. Estos datos muestran por primera vez, evidencia de la presencia de genes que participan en la formación de biopelículas en cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis.*

Palabras clave: gen *pili*; gen *srtA*; gen *inu*, gen *epsD*, bioinformática.

INTRODUCCIÓN

Lactobacillus delbrueckii, descrita inicialmente como *Bacillus delbreuckii* por Leichmann en 1896, corresponde a una especie de bacterias grampositivas, productoras de ácido láctico. Desde su descubrimiento ha tenido una larga historia de aplicaciones en la microbiología y en la industria alimentaria, especialmente en la obtención de alimentos derivados de la fermentación láctica. En la actualidad, la especie comprende seis subespecies: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*, *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* y *L. delbrueckii* subsp. *indicus*. Estudios de genómica comparativa han demostrado que este grupo posee una alta diversidad intraespecífica, lo cual explica las diferencias en cuanto a los hábitats que ocupan y sus requerimientos nutricionales (Baek *et al*., 2023). Dentro del grupo de *L. delbrueckii*, las subespecies, *bulgaricus* y *lactis* son de mayor importancia comercial debido a su uso como cultivos iniciadores de varios alimentos derivados de lácteos, especialmente en la elaboración de queso y yogurt, junto con *Streptococcus thermophilus* (Rizzello y De Angelis, 2011), ya que mejoran la textura y el sabor de los productos.

*Autor para correspondencia: América Ivette Barrera-Molina
Correo-e: america.barrera@uaem.mx
Recibido: 19 de agosto de 2024
Aceptado: 9 de octubre de 2024
Publicado: 27 de noviembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2423

Adicionalmente, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* son microorganismos considerados GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros, por sus siglas en inglés), y presentan actividades probióticas con beneficios demostrados para la salud. Estos beneficios incluyen la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en la mucosa intestinal (Oyeniran *et al*., 2020), efectos protectores en modelos de mucositis (De Jesus *et al*., 2019), inmunomodulación a nivel local y sistémico, y la mejora de parámetros bioquímicos de la sangre en estudios *in vivo* (Suzzi *et al*., 2020). El mecanismo probiótico de estas bacterias incluye la producción de ácido láctico, que reduce el pH del intestino e inhibe el crecimiento de patógenos, y la producción de bacteriocinas, que son sustancias antimicrobianas. Además contribuyen a la barrera intestinal y modulan el sistema inmunológico (El-Sayed *et al*., 2021). Sin embargo, para que estas bacterias proporcionen dichos beneficios, dependen en gran medida de la asimilación de determinadas fuentes de carbono, la producción de sustancias microbianas como las bacteriocinas y la capacidad de colonización de la mucosa intestinal, un proceso que está estrechamente relacionado con la formación de biopelículas (De Jesus *et al*., 2022).

Las biopelículas son comunidades microbianas estructuralmente organizadas, embebidas en una matriz compleja de exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN exógeno, y sustancias inorgánicas, que se adhieren a superficies sólidas o en interfaces superficiales (Sadekuzzaman *et al*., 2015).

Las especies bacterianas del género *Lactobacillus* son capaces de formar biopelículas una vez que alcanzan una densidad poblacional que permite la comunicación sincrónica entre ellas, un proceso conocido como "quorum sensing" (Lebeer *et al*., 2007). Cuando ocurre esta transición, se activa un sistema de comunicación mediante de señales químicas y se regula la expresión de genes específicos cuyos productos principales son los agentes que determinan la formación de las biopelículas (Ruiz *et al*., 2016). Sin embargo, es importante destacar que los reportes y estudios sobre la caracterización de los elementos genómicos asociados a la formación de las biopelículas en *L. delbrueckii*, son limitados. El propósito principal del este estudio es explorar las secuencias de ADN asociadas a la formación de las biopelículas en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* mediante herramientas de genómica comparativa. Este tipo de análisis permite inferir relaciones filogenéticas y comparar la existencia de elementos de regulación vinculados a secuencias de ADN entre diferentes cepas, así como la conservación de unidades transcripcionales relacionadas con la formación de estructuras y/o procesos celulares (de Crécy-Lagard *et al*., 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recuperación de secuencias genómicas y selección de genes asociados a formación de biopelículas

Los genomas bacterianos pertenecientes a cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se recuperaron de la base de datos pública GenBank en formato FASTA y GFF. Los genomas seleccionados estaban completamente secuenciados a la fecha de junio del 2021.

Para seleccionar genes que participan en la formación de biopelículas, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura donde se caracterizaron genes y/o proteínas involucradas en las etapas de formación de biopelículas del género *Lactobacillus*. Una vez identificados los genes, se hizo la búsqueda de las secuencias codificantes en la base de datos pública GenBank y las secuencias se recuperaron en formato FASTA.

Análisis de identidad de las secuencias nucleotídicas y peptídicas

Una vez seleccionados los genes a estudiar, se buscaron en los genomas bacterianos de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* utilizando las herramientas bioinformáticas BLASTN y BLASTP. Las secuencias nucleotídicas y/o peptídicas identificadas de los genomas bacterianos se sometieron a un análisis de identidad mediante un alineamiento local de secuencias nucleotídicas y/o peptídicas empleando los servidores BLASTN y BLASTP, con el objetivo de determinar el grado de conservación entre ambas subespecies (Altschup *et al*., 1990). De los genes seleccionados se obtuvieron las secuencias peptídicas para analizar regiones o dominios proteicos de relevancia mediante los servidores UniProtKB de Expasy e Interpro.

Análisis de unidades transcripcionales y contexto genómico

Con la finalidad de identificar si los genes seleccionados se encuentran en unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas se empleó el programa Operon-mapper, el cual analiza la distancia intergénica de genes vecinos y las relaciones funcionales de sus productos codificantes (Taboada *et al*., 2018). Por otro lado, el análisis del contexto genómico se realizó por medio del software Artemis (Rutherford *et al*., 2000). Subsecuentemente se utilizó el programa VISTA para la detección de diferencias en la presencia y orden de los genes que forman parte de las unidades transcripcionales (Frazer *et al*., 2004).

Detección de elementos reguladores

La identificación de potenciales factores de transcripción involucrados en la formación de las biopelículas, se realizó en dos etapas sucesivas: una búsqueda de reguladores transcripcionales descritos en la base de datos del NCBI tomando a *Bacillus subtilis* como microorganismo modelo, posteriormente, dichas secuencias fueron identificadas en los genomas de estudio pertenecientes a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

A continuación se recuperó la secuencia corriente arriba (400 pb) de los genes seleccionados utilizando el servidor RSAT: Prokaryotes (http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/index.php) (Santana-Garcia *et al*., 2022). Con los programas Oligo-analysis y dyad-analysis (Defrance *et al*., 2008), se determinó si la secuencia corriente arriba identificada presenta motivos de unión a potenciales factores de transcripción en la formación de las biopelículas.

RESULTADOS

Genomas bacterianos

El análisis de los genomas de referencia reportados en la base de datos Genbank mostró la anotación de 104 secuencias genómicas pertenecientes a 6 subespecies de *L. delbrueckii*, de las cuales sólo 27 genomas se encontraron secuenciados completamente. Las secuencias genómicas pertenecen a las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (11.5 %), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (6.7 %) y cepas de otras subespecies (7.6 %). Siendo los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* los más representados de las cepas de *L. delbrueckii*.

Se recuperaron las secuencias genómicas completas en formato FASTA de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12 genomas) y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7 genomas) y se analizaron los datos reportados en la base de datos, de donde se observa que el tamaño del genoma de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es de aproximadamente 1.8 Mb, mientras que los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, se encuentran en un rango de 2.0 a 2.3 Mb. Ambas subespecies cuentan con un porcentaje de GC inferior al 50 % y un promedio de secuencias codificantes (CDS) de 1615. No obstante, cerca del 40 % de CDS presentan una función desconocida (Tabla 1).

Selección de genes asociados a la formación de biopelículas

Como primer paso para la elección de genes involucrados en la formación de biopelículas se hizo una revisión bibliográfica exhaustiva donde se analizaron genes y/o proteínas que participan en las etapas de formación de biopelículas de bacterias ácido-lácticas. De este análisis minucioso se seleccionaron diez genes bastante bien caracterizados, los genes: *pili*, *welE*, *luxS*, *msa*, *ccpA*, *gadph*, *srtA*, *inu, bfrK* y *epsD* (Leeber *et al*., 2012; Malik *et al*., 2013; Walter *et al*., 2008; Hao *et al*., 2011). Estos genes fueron buscados en los genomas de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Los resultados muestran que existen genes asociados al metabolismo de carbohidratos con mayor frecuencia en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que genes asociados a la adhesión a superficie se identificaron de forma relevante en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Figura 1). De los diez genes analizados, se seleccionaron 4 genes con evidencia experimental asociada a diferentes etapas de la formación de biopelículas en bacterias del género *Lactobacillus*; *pili* (pilina) y *srtA* (sortasa de clase A), son genes que codifican a enzimas involucradas en las etapas de adhesión primaria y secundaria; y los genes *inu* y *epsD*, los cuales participan en la etapa de maduración de las biopelículas produciendo homo y heteropolisacáridos (Tabla 2).

Tabla 1. Características generales de los genomas de las cepas de las subespecies de *L. delbrueckii*. El análisis de los genomas de cada cepa reveló que presentan un tamaño de aproximadamente 1.8 Mb, para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se encuentran en un rango de 2.0 a 2.3 Mb. En ambas subespecies se identificó un porcentaje de GC inferior al 50 % y un promedio de secuencias codificantes (CDS) de 1615.
Table 1. General characteristics of the *L. delbrueckii* subspecies strains genomes. The analysis of each strain's genomes revealed that they have a size of approximately 1.8 Mb for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, while the genomes of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* range from 2.0 to 2.3 Mb. Both subspecies were found to have a GC content below 50% and an average of 1615 coding sequences (CDS).

Organismo	Cepa	Acceso GenBank	Tamaño (Mb)	%GC	CDS
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	LJJ	CP049052.1	1.89109	49.5	1620
	KLDS1.1011	CP041280.1	1.88749	49.8	1629
	MN-BM-F01	CP013610.1	1.87507	49.7	1598
	KLDS1.0207	CP032451.1	1.86918	49.8	1625
	DSM 20080	CP019120.1	1.86818	49.8	1585
	ND04	CP016393.1	1.86175	49.6	1544
	ACA-DC 87	LT899687.1	1.856	49.8	1585
	L99	CP017235.1	1.84811	49.7	1580
	ATCC 11842	CR954253.1	1.865	49.7	1572
	2038	CP000156.1	1.87292	49.7	1584
	ND02	CP002342.1	2.13198	49.59	1855
	ATCC BAA-365	CP000412.1	1.85695	49.7	1595
L. delbrueckii subsp. *lactis*	KCCM 34717	CP018215.1	2.26338	49.1	1958
	DSM 20072	CP022988.1	2.16598	49	1796
	KCTC 3034	CP023139.1	2.23761	49	1881
	Lactobacillus delbrueckii subsp. l*actis* 1	LS991409.1	2.05032	49.6	1680
	KCTC 3035	CP018156.1	1.97273	50	1695
	NWC_1_2	CP029251.1	2.25977	48.5793	1909
	MAG_rmk202_ldel	CP046131.1	2.18449	48.9603	1801

Figura 1. Identificación de secuencias con similitud significativa con genes asociados a la formación de biopelículas en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Los genes *pili*, *welE*, *msa*, *gadph* y *srtA* son genes asociados a la adhesión celular, mientras que el gen *luxS* esta media el mecanismo del "quorum sensing". El gen *ccpA* se ha descrito como un regulador del crecimiento bacteriano, y el gen *bfrK* participa en un complejo de regulación de dos componentes. Finalmente, los genes *inu* y *epsD* participan en la síntesis de polisacáridos.
Figure 1. Identification of sequences with significant similarity to genes associated with biofilm formation in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. The *pili*, *welE*, *msa*, *gadph*, and *srtA* genes are associated with cell adhesion, while the *luxS* gene mediates the "quorum sensing" mechanism. The *ccpA* gene has been described as a regulator of bacterial growth, and the *bfrK* gene is involved in a two-component regulatory system. Finally, the *inu* and *epsD* genes are involved in polysaccharide synthesis.

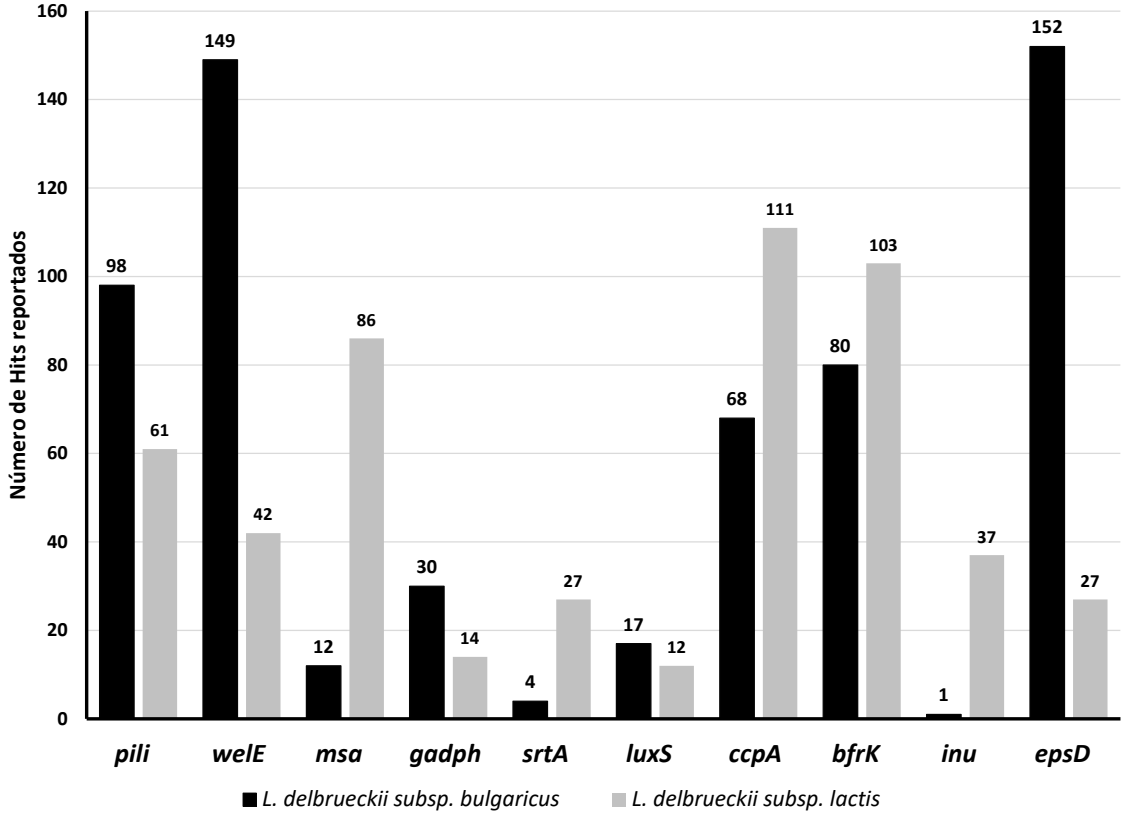


Tabla 2. Genes seleccionados involucrados en la formación de biopelículas. Los genes *pili*, *srtA*, *inu* y *epsD* fueron seleccionados para una caracterización bioinformática en los genomas de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.
Table 2. Selected genes involved in biofilm formation. The *pili*, *srtA*, *inu*, and *epsD* genes were selected for a bioinformatic characterization in the genomes of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains.

Gen	Función	Organismo	Referencia
pili	Pilina, involucrada en la adhesión y agregación bacteriana	*Lactobacillus rhamnosus*	Leeber *et al*., 2012
srtA	Sortasa de clase A, responsable de anclar covalentemente las proteínas de superficie a la pared celular	*Lactobacillus plantarum*	Malik *et al*., 2013
inu	Inulosacarasa, implicada en la producción de glucanas y fructanas (síntesis de homopolisacáridos)	*Lactobacillus reuteri*	Walter *et al*., 2008
epsD	Proteína de síntesis de heteropolisacáridos	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	Hao *et al*., 2011

Caracterización bioinformática de los genes asociados a la formación de biopelículas

La caracterización de los genes asociados a la formación de biopelículas se realizó a parir de los archivos en formato GFF. La búsqueda inicial del gen *pili* en los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* indicó que corresponde a una secuencia anotada como Prepilin-type N-terminal con una extensión de 324 nucleótidos. El alineamiento local de la secuencia de nucleótidos mostró que el gen de Prepilin-type N-terminal se encuentra presente en el 100 % de los genomas de estudio, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7). Se identificó un porcentaje de identidad global en un rango del 97.2 % al 98.77 % para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y del 98.46 % al 100 % para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Tabla 3). Con respecto al gen *srtA* presenta una extensión de aproximadamente 702 nucleótidos y una localización muy variable según entre las subespecies y las diferentes cepas, está presente en el 100 % de los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (12) y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (7), y el alineamiento nucleotídico reveló un rango de identidad del 98.15 % al 99.98 % para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de entre 99.15 % y 100 % para *L. delbrueckii* subsp. *lactis.* (Tabla 3).

La etapa de maduración de las biopelículas consta de la síntesis de exopolisacáridos, que se pueden clasificar en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. El gen *epsD* participa en la síntesis de heteropolisacáridos durante la formación de la biopelícula, la secuencia genética de aproximadamente 777 pb fue determinada en el 100 % (12/12) de los genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, con un porcentaje de identidad superior de 96.78 %. Por otro lado, dicha secuencia fue identificada en el 71.4 % (5/7) de los genomas de la subespecie *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. No se obtuvieron resultados positivos para las cepas KCCM 34717 y KCTC 3034 (Tabla 3).

Partiendo de la secuencia codificante de la inulosacarasa (*inu*) de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 se realizó un análisis de identidad para identificar proteínas homólogas en los genomas de estudio, teniendo como resultado la detección de cuatro proteínas: dos glicosil hidrolasas de la familia 68, una levansacarasa y una proteína hipotética LDE04_11610 con porcentajes de identidad del 43.83, 43.48, 43.83 y 45.15 % respectivamente (Tabla 4).

Análisis de familias y dominios funcionales

El análisis de familias y dominios proteicos realizado en Interpro mostró que la secuencia de aminoácidos del Prepilin-type

Tabla 3. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *pili, srtA* y *epsD*. Para el alineamiento se utilizaron los genes de [1]*L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 y a [2]*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 como genes de referencias. N.D., no determinado.
Table 3. Nucleotide sequence alignment of the *pili*, *srtA*, and *epsD* genes. The genes from [1]*L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 and [2]*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 were used as reference genes for the alignment. N.D., not determined.

Organismo	Cepa	% Identidad		
		***pili*[1]**	***srtA*[1]**	***epsD*[2]**
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	ATCC 11842 = JCM 1002	97.22	99.00	96.01
	ND02	98.77	99.29	94.85
	LJJ	96.91	98.86	96.78
	KLDS1.1011	97.22	99.00	94.85
	MN-BM-F01	97.22	98.15	94.85
	2038	97.84	98.58	100
	KLDS1.0207	97.53	98.86	94.85
	DSM 20080	97.53	98.86	94.85
	ND04	97.22	98.43	98.58
	ATCC BAA-365	97.84	98.72	96.40
	ACA-DC 87	97.84	98.43	95.24
	L99	97.84	99.15	95.88
L. delbrueckii subsp. *lactis*	DSM 20072	100	99.57	94.72
	KCTC 3034	100	100	N.D.
	Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*1	100	99.43	94.98
	KCTC 3035	100	99.15	95.75
	NWC_1_2	100	99.57	93.83
	MAG_rmk202_ldel	100	99.72	93.83

Tabla 4. Determinación de secuencias similares al gen *inu* de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 mediante análisis BLASTX. Se identificaron 4 secuencias con similitud al gen *inu* en genomas de algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii*, cuya función está relacionada con la síntesis de carbohidratos.
Table 4. Determination of sequences similar to the *inu* gene of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 through BLASTX analysis. Four sequences similar to the *inu* gene were identified in the genomes of some *Lactobacillus delbrueckii* strains, whose function is related to carbohydrate synthesis.

Microorganismo	Nombre	Cobertura	E-Value	% Id	Acceso
Lactobacillus delbrueckii	Glucósido hidrolasa de la familia 68	63 %	3.00E-142	43.83	WP_035182812.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* DSM 20072	Levansacarasa	63 %	4.00E-142	43.83	EGD27493.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*	Glucósido hidrolasa de la familia 68	63 %	7.00E-141	43.48	WP_003614406.1
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*	Proteína hipotética LDE04_11610	59 %	2.00E-139	45.15	EGD27493.1

N-terminal pertenece a la familia de la proteína de competencia "ComGC", la cual representa una *pseudo*pilina, a su vez conserva diferentes elementos, como el sitio de metilación procariota N-terminal, el dominio de escisión N- terminal y el motivo de metilación procariota N-terminal. El alineamiento de la secuencia peptídica determinó un porcentaje de identidad superior al 98.14 %. Las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ y ND04 presentaban hasta tres variaciones de nucleótidos, mientras que el resto únicamente presentaban dos modificaciones. Se analizó tambien si existían cambios puntales de aminoácidos entre las secuencias peptídicas. Las modificaciones de aminoácidos detectadas se encuentran en sitios de unión entre dominios. El residuo nueve es quien presenta cambios más frecuentes, cambiando una glutamina (Q) por una prolina (P); pero también se encontraron cambios en la posición 21 entre una valina (V) y una leucina (L).

Por su parte, la proteína sortasa de clase A, pertenece a la familia sortasa, se caracteriza por anclar un gran número de proteínas de superficie funcionalmente distintas que contienen una señal de clasificación de pared celular bacteriana. La secuencia peptídica muestra un porcentaje de identidad superior del 99.57 %. Adicionalmente, se identificaron cambios de aminoácidos entre ambas subespecies, los cuales se presentan en los sitios de unión entre dominios. Los cambios observados en esta secuencia de aminoácidos no se presentan en el sitio activo ni en el sitio catalítico, se dan en sitios de unión entre dominios. Los cambios más significativos son entre una Asparagina (N) y un Aspartato (D) en la posición 204, mientras que la segunda variación con mayor incidencia fue en la posición 148, entre una Alanina (A) y una Glicina (G).

En relación con las enzimas vinculadas a la síntesis de exopolisacáridos, la secuencia codificante del gen *epsD* produce una proteína de 259 aminoácidos que forma parte de la familia de proteínas de síntesis de polisacáridos capsulares CpsB/CapC y contiene un dominio similar a PHP (polimerasa e histidiol fosfatasa). La secuencia peptídica de la proteína mostró un porcentaje de identidad superior del 98.45 %.

Análisis del contexto genómico

El análisis de identificación de operones asociados a la adherencia a superficies en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 realizado mediante el programa computacional Operon-mapper, permitió determinar que el gen correspondiente a la Pre-pilina tipo N-terminal se localizaba en un operón conformado por seis secuencias codificantes con las coordenadas genómicas 567122-570612. La unidad genética transcripcional comprende los genes: *comGC*, *comGD*, *comGF*, un regulador transcripcional, entre otras proteínas relacionadas a la síntesis de proteínas de membrana y adquisición de ADN exógeno.

Así mismo, se identificó que el gen *srtA* correspondiente a la sortasa de clase A se encontraba inmerso en un operón constituido por ocho genes localizado en la posición 1166395-1176625. Dicho operón está constituido por 8 genes, presentando un tamaño aproximado de 10.5 Kb. La unidad genética transcripcional se encuentra conformado por los genes: *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *hrcA*, un regulador transcripcional, un gen codificante para una exonucleasa y una proteína de integración. Este hallazgo denota que los 8 genes que componen la unidad genética transcripcional podrían estar estructuralmente conservados, al menos entre los microorganismos *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCCM 34717 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038.

La síntesis de heteropolisacáridos se caracteriza por la participación de varios genes. El análisis del contexto genómico mostró que el gen *epsD* se encontraba en un operón asociado a la síntesis de exopolisacáridos. El operón tiene una extensión aproximada de 10.5 Kb y se compone por los genes: *epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD*, *epsF*, *epsG*, *epsJ*, *epsK*, *epsM*, entre otros. La mayoría de estos genes codifican para glucosiltransferasas y galactosiltransferasas, enzimas que catalizan la transferencia de azúcares para la síntesis de polisacáridos. El mismo análisis en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 reveló que se encuentra en un operón compuesto únicamente por 5 genes que codifican para proteínas relacionadas a la síntesis de exopolisacáridos y comprenden una extensión aproximada de 4.4 Kb, 6 Kb menos que en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Así mismo, existe la presencia de proteínas hipotéticas, es decir enzimas con función desconocida. Es importante destacar que, ningún gen se encuentra anotado como "Eps" por lo que se infiere que la unidad genética transcripcional para la síntesis de exopolisacáridos está

presente pero no se encuentra caracterizada en los genomas estudiados.

Elementos reguladores asociados a la formación de las biopelículas

La búsqueda de factores de transcripción identificó un regulador transcripcional maestro asociado a la formación de biopelículas codificado por el gen *sinR* estudiado en *Bacillus subtilis*. Esta secuencia reguladora fue potencialmente identificada en el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* mediante un alineamiento local de secuencias peptídicas. El análisis indicó la presencia de una proteína llamada Helix-turn-helix Domain-containing con una cobertura de extensión de 45 % y un E-value de $2x10^{-9}$.

Finalmente, la búsqueda de proteínas relacionadas a factores de transcripción con dominio Helix-turn-helix mostró la presencia de tres potenciales elementos reguladores en el 100 % de los genomas estudiados. Para el caso del regulador transcripcional, con el número de acceso WP_099279028.1 ubicado con las coordenadas genómicas 1665100-1665459 en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038, se encontró que está anotado como una proteína hipotética conservada, además tiene secuencias genéticas adyacentes que codifican para proteínas hipotéticas y proteínas de biosíntesis de exopolisacáridos, entre ellas glucosiltransferasas.

Sitios de unión de factores de transcripción

Con el objetivo de identificar elementos de regulación en *cis*, se llevó a cabo un análisis de identificación de secuencias de unión a factores de transcripción mediante el software Oligo-analysis. Los resultados muestran una lista de motivos de unión ordenados significativamente. En la región río arriba (400 pb) de los operones que contienen los genes *Prepilin-N-terminal*, *srtA* y *epsD*, se identificaron ocho oligonucleótidos significativamente sobrerrepresentados (Figura 2).

El oligonucleótido de mayor rango, GCTGGA, se encuentra siete veces a lo largo de la secuencia región corriente arriba, mientras que se esperarían 0.47 ocurrencias por casualidad. El P-value (occ_p = 6.2×10^{-7}) indica la probabilidad de observar al menos 7 ocurrencias cuando se esperan 0.47. El número esperado correspondiente de falsos positivos es bajo (occ_E = 1.3×10^{-3}), lo que indica que es poco probable que la sobrerrepresentación sea resultado del azar. La sección correspondiente al *Pattern asembly* del ensamble número uno muestra que los hexanucleótidos GCTGGA y CCAGCG se pueden ensamblar para formar un solo motivo: CGCTGGA (Figura 2).

DISCUSIÓN

Ante el crecimiento exponencial de datos disponibles de múltiples proyectos de secuenciación de genomas procariotas, la atención se ha centrado en comparaciones intraespecíficas que permitan descubrir genes asociados a procesos celulares específicos. Los análisis de secuencias intraespecíficas han demostrado ser fundamentales en la mejora de las anotaciones existentes, la identificación de nuevas regiones de codificación y la predicción de elementos reguladores (Windsor y Mitchell-Olds, 2006).

Los resultados del análisis bibliométrico mostraron que cuatro genes son fundamentales en las etapas de adhesión y maduración de las biopelículas (Tabla 2). Los genes seleccionados fueron el codificante a la subunidad monomérica de la pilina, proteína involucrada en la adhesión de las células bacterianas a una superficie sólida y responsables de la agregación celular para la formación de microcolonias (Lebeer *et al*., 2012; Oxaran *et al*., 2012). El gen *srtA* que se traduce en una proteína denominada sortasa de clase A, responsable de anclar covalentemente las proteínas de superficie a la pared celular (Malik *et al*., 2013). El gen *inu*, implicado en la producción de glucanas y fructanas en el proceso de síntesis de homopolisacáridos (Lebeer *et al*., 2009) y el gen *epsD* que forma parte de una unidad transcripcional policistrónica asociada a la síntesis de heteropolisacáridos (Lamothe *et al*., 2002). En la figura 3 se observa la posible activación de genes específicos que controlan el desarrollo y progreso de la biopelícula.

Las proteínas de adhesión en el género *Lactobacillus* son fundamentales para la adherencia eficiente a las células epiteliales intestinales y dar lugar a la agregación celular y

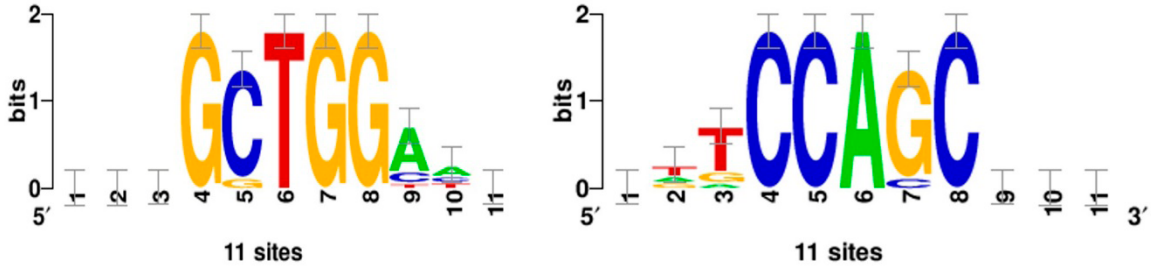


Figura 2. Logotipos de los motivos de unión a factores de transcripción identificados mediante el software Oligo-analysis. El análisis de la región río arriba (400 pb) de los operones que contienen los genes *pili*, *srtA* y *epsD*, reveló ocho oligonucleótidos significativamente sobrerrepresentados, de los cuales el hexanucleótido GCTGGA es el más representado. La evaluación con la herramienta bioinformática *Pattern asembly* mostró que los hexanucleótidos GCTGGA y CCAGCG se pueden ensamblar para formar un solo motivo CGCTGGA.
Figure 2. Logos of transcription factor binding motifs identified using Oligo-analysis software. Analysis of the upstream region (400 bp) of the operons containing the *pili*, *srtA*, and *epsD* genes revealed eight significantly overrepresented oligonucleotides, among which the hexanucleotide GCTGGA is the most represented. Evaluation with the bioinformatics tool Pattern Assembly, showed that the hexanucleotides GCTGGA and CCAGCG can be assembled to form a single motif, CGCTGGA.

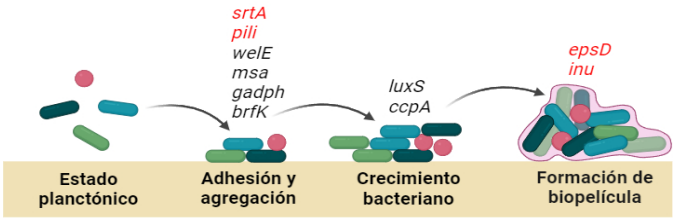


Figure 3. Modelo hipotético de activación de genes específicos que controlan el desarrollo y progreso de la biopelícula. Las bacterias libres (planctónicas) se acercan y se adhieren de manera reversible a una superficie. En seguida, comienzan a segregar componentes extracelulares (genes *srtA*, *pili*, *welE*, *msa* y *gadph*), lo que las fija de forma más estable y permite su agregación (regulado por el gene *bfrk*, si el mecanismo de adhesión depende de sacarosa). A medida que proliferan (gen *ccpA*), las bacterias inician la formación de la biopelícula, mediante la secreción de polisacáridos (genes *epsD* e *inu*). Durante este proceso, se comunican mediante señales químicas (quórum sensing, gen *luxS*), lo que les permite coordinar su crecimiento y organizar la estructura de la biopelícula.

Figure 3. Hypothetical activation model of specific genes controlling biofilm development and progression. Free (planktonic) bacteria approach and adhere reversibly to a surface. Next, they begin to secrete extracellular components (srtA, pili, welE, msa, and gadph genes), which anchor them more stably and allow their aggregation (regulated by the *bfrk* gene if the adhesion mechanism depends on sucrose). As they proliferate (*ccpA* gene), the bacteria initiate the formation of the biofilm through the secretion of polysaccharides (*epsD* and *inu* genes). During this process, they communicate via chemical signals (quorum sensing, *luxS* gene), allowing them to coordinate their growth and organize the biofilm structure.

una subsecuente formación de las biopelículas (Lebeer *et al*., 2012). La secuencia nucleotídica del gen anotado como Prepilin-type N-terminal se encuentran altamente conservado entre ambas subespecies, sin embargo, no se encuentran en la misma posición del genoma, esto podría ser explicado debido a que los genomas bacterianos pueden cambiar drásticamente en tamaño, repertorio de genes y sintenia entre las diferentes cepas o linajes ambientales (Cuadros-Orellana *et al*., 2007).

La secuencia peptídica identificada de la pilina pertenece a la familia de la proteína de competencia ComGC, presenta un motivo de metilación procariota N-terminal. Estos resultados sugieren que la proteína determinada posiblemente sea una pilina tipo IV, las cuales se definen por un motivo de secuencia N-terminal conocido como péptido señal de clase III (Giltner *et al*., 2012). Esta proteína se encuentra en la mayoría de las bacterias confiriendo una variedad de funciones, incluyendo adhesión, motilidad, secreción de proteínas y absorción de ADN (Sheppard *et al*., 2020).

Adicionalmente Laurenceau *et al*. (2013) reportó que las proteínas tipo pilina están compuestas principalmente por la subunidad mayor (comGC) y se ensamblan mediante una maquinaria simple compuesta por cuatro pilinas menores (comGD, comGE, comGF y comGG), una pre-pilina peptidasa (comC), una extensión ATPasa (comGA) y una proteína de plataforma (comGB). Los hallazgos encontrados en el presente estudio sugieren la presencia del gen codificante a una pilina de tipo IV en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* como estructura de adherencia. Esta misma, al ser una proteína de competencia podría estar potencialmente relacionada con el mecanismo de adquisición de ADN exógeno, siendo este un componente principal de las biopelículas, razón que puede explicar el fenómeno de adherencia. Adicionalmente, los pili de tipo IV son esenciales en una gran diversidad de especies bacterianas, ya que contribuyen a distintos procesos como la motilidad espasmódica, competencia natural, formación de biopelículas o microcolonias y adhesión de células huésped (Ronish *et al*., 2019).

Por otro lado, el gen *srtA* que codifica a la sortasa de clase A se identificó en el 100 % de los genomas de estudio (Tabla 3). De acuerdo con Guiton *et al*. (2009), factores como las sortasas, la autolisina y el ADN extracelular se han asociado a la producción de las biopelículas. Evidencias experimentales revelan que, cuando es eliminado el gen *srtA*, se ve afectada la etapa de maduración de las biopelículas en *Enterococcus faecalis*. En *Lactobacillus plantarum* una deleción génica en el gen *srtA* muestra una disminución en la adherencia a las células epiteliales y perdida de la capacidad para formar biopelículas (Malik *et al*., 2013).

El gen *srtA* se identificó en una unidad transcripcional que comprende los genes *hrcA*, *dnaK*, *dnaJ*, *lepA* y *recJ*. Dichos genes han sido relacionados con la formación de biopelículas en algunas especies del género *Lactobacillus*. En correlación con De Angelis *et al*. (2015) cuando *L. plantarum* DB200 forma su biopelícula, se incrementan los niveles de algunas proteínas de estrés como DnaJ y GroEL. Los altos niveles de estas proteínas pueden contribuir a una mayor supervivencia de las células en condiciones de estrés por calor (De Angelis *et al*., 2015) y ejercer protección cruzada frente a otros choques ambientales (De Angelis *et al*., 2004). Además, dichas proteínas también muestran propiedades adhesivas e inmunomoduladoras (Pessione, 2012).

En la actualidad, no existen reportes en la literatura sobre proteínas de biosíntesis de homopolisacáridos en los genomas de estudio (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*). Sin embargo, al realizar un análisis del tipo BLASTX utilizando la secuencia codificante de la Inulosacarasa de *L. reuteri* TMW 1106.1 se reveló la presencia de 4 proteínas homólogas de las cuales dos son glicosil hidrolasas, una levansacarasa y una proteína hipotética (Tabla 4). *L. reuteri* es una bacteria ácido-láctica formadora de biopelículas que se ha encontrado con mayor prevalencia en individuos con obesidad que en individuos con normopeso (Million *et al*., 2012). Adicionalmente, Jones y Versalovic (2009) demostraron que la biopelícula formada por *L. reuteri* modula la producción de citocinas y produce sustancias antiinflamatorias. Estos resultados indican que, solo algunas cepas pertenecientes a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* contienen al menos una proteína relacionada a la síntesis de homopolisacáridos. Para el caso particular de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072 se identificó una proteína compuesta por 1091 aminoácidos denominada levansacarasa, por lo que se podría inferir que el homopolisacárido sintetizado por dicho microorganismo es una fructana de tipo levana. Este resultado es altamente significativo, puesto que las especies pertenecientes al grupo de *Lactobacillus*

delbrueckii presentan genomas muy similares, de hecho, no se pueden diferenciar al utilizar la secuencia del *rrs* que codifica el RNA 16S. Nuestro hallazgo confirma la existencia de un gen específico de cepas asociado al metabolismo de los carbohidratos responsables de catalizar la formación de polímeros de fructosa ya sean lineales o ramificados a partir de sacarosa (Tieking y Gänzle, 2005).

Según Schwab *et al*. (2007) la inactivación de los genes *inu* y *ftfA* (codifica una levansacarasa) elimina por completo la síntesis de homopolisacáridos en *L. reuteri* TMW1.106 y *L. reuteri* LTH5448. Además, evidencias experimentales postulan que estos genes confieren importantes atributos ecológicos a *L. reuteri* TMW1.106 ya que, contribuyen a la colonización en el tracto gastrointestinal del huésped (Walter *et al*., 2008). Identificar secuencias homologas de estos genes en las especies *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* es de suma importancia, ya que, pudieran cumplir una función similar en la síntesis de exopolisacáridos y en el proceso de adherencia a las células epiteliales del intestino.

Los heteropolisacáridos se caracterizan por ser sintetizados mediante la acción conjunta de un grupo de genes denominados *eps*, los cuales se pueden localizar tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Caggianiello *et al*., 2016). Estos genes han sido reportados en *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus sp.* (Ruas-Madiedo, 2009). En el presente estudio se identificó el gen *epsD* con las coordenadas genómicas 1683916-1694141 en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Dicho gen se encontraba inmerso en una unidad transcripcional policistrónica compuesta por los genes *epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD*, *epsF*, *epsG*, *epsJ*, *epsK*, *epsM*, entre otros, presentando una extensión aproximada de 10.5 Kb. En conformidad con Zeidan *et al*. (2017) los grupos de genes *eps* (u operones) tienen un tamaño de 15 a 20 Kb y comprenden menos de 30 genes.

El presente estudio encontró cierta variabilidad en la extensión y composición del operón *eps* entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Una posible explicación de este resultado se debe a que el programa Operon-mapper se basa en la distancia intergénica de genes vecinos y en las relaciones funcionales de sus productos codificantes. Por lo que una distancia intergénica mayor a la que detecta el programa pudo discriminar la cantidad de genes presentes en el operón con respecto a lo reportado en la literatura. De forma general se ha descrito que, en las Bacterias Ácido Lácticas, los genes que conforman el operón *eps* suelen tener la misma orientación y se transcriben como un solo ARN mensajero (Lamothe *et al*., 2002). Esta postulación coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que, el operón responsable de la síntesis de EPS se encuentra en la misma dirección tanto en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 como en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072.

Adicionalmente, Hao *et al*., 2011 menciona que, el grupo de genes *eps* propio de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 muestra diferencias significativas contra *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BAA365 con respecto a la ganancia y pérdida de algunos genes que codifican glucosiltransferasas. Por lo tanto, la unidad de repetición EPS producida por los grupos de genes de la cepa 2038 debe ser diferente de la ATCC 11842 y BAA365 asumiendo que cada cepa sintetiza un heteropolisacárido único.

Si bien se necesitan múltiples productos genéticos para el desarrollo de biopelículas, en *Bacillus subtilis* la decisión de cambiar de un estado planctónico de vida libre a un estado de formación de biopelículas se rige por SinR, el regulador transcripcional maestro de la formación de biopelículas (Newman *et al*., 2013). Los resultados de la presente investigación mostraron 3 proteínas con porcentajes de identidad significativos contra SinR con el nombre *Helix-turn-helix transcriptional regulator* y los códigos de accesos WP_099279028.1, WP_072547665.1 y WP_072547106.1. De acuerdo con Branda *et al*. (2001), SinR es un represor transcripcional que se une a la región promotora del operón responsable de la biosíntesis de exopolisacáridos EpsA-O.

A pesar de haber detectado 3 proteínas homologas, únicamente WP_099279028.1 presenta como genes vecinos a proteínas asociadas a la biosíntesis de exopolisacáridos como, por ejemplo, glucosiltransferasas, hecho que nos brinda la posibilidad de inferir que este regulador transcripcional esta potencialmente relacionado en la regulación del operón *eps* en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Además de la proteína SinR, se han identificado otros factores de transcripción que están relacionados con la regulación de algunos genes durante el cambio en el estilo de vida de un estado planctónico al sésil. Entre ellos, ccpA, un regulador transcripcional clave de la respuesta a la limitación de carbohidratos inicialmente descrito en *L. plantarum* (Muscariello *et al*., 2013). Por otro lado, se ha reportado que la proteína BrpA regula el desarrollo de biopelículas en *S. mutans* (Wen *et al*., 2006).

Los elementos regulatorios que actúan en *cis* se pueden definir como una secuencia de ADN no codificante responsable de la transcripción de los genes cercanos (Wittkopp *et al*., 2012). El descubrimiento de este tipo de secuencias puede desempeñar un papel crucial en el descifrado de las secuencias del genoma y en la interpretación de los datos del transcriptoma (Defrance *et al*., 2008). Se han empleado una gran diversidad de enfoques para la identificación de elementos que actúan en *cis* entre especies. Algunos de ellos se basan en la identificación de patrones en especies evolutivas considerablemente distantes (Alkema *et al*., 2004) y algunos otros en la comparación de especies directamente relacionadas (Yan *et al*., 2004).

En el presente estudio se identificaron dos motivos altamente significativos, GCTGGA y GAATGGTC en las regiones corriente arriba de los genes conservados y las unidades transcripcionales predichas en los diferentes genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Figura 2). Este tipo de análisis bioinformático se ha empleado para la detección de motivos de unión específicos en *L. plantarum* en el que se detectaron 6 patrones de secuencia en la

región corriente arriba de genes asociados al metabolismo de fructooligosacáridos (Chen *et al*., 2015), resultados que posteriormente fueron confirmados mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Este resultado es altamente significativo para dar pie al diseño de protocolos experimentales que permitan reafirmar los motivos de unión detectados mediante análisis bioinformáticos.

CONCLUSIONES

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* son dos subespecies dentro del grupo de *Lactobacillus delbrueckii* con genes altamente conservados. El presente estudio demuestra que ambas subespecies presentan elementos genómicos para formar biopelículas, especialmente los genes relacionados a mecanismos de adhesión (*pili* y *srtA*) y síntesis de exopolisacáridos (*inu* y *epsD*), correspondientes a las etapas de adherencia y maduración de las biopelículas.

Los genes *pili*, *epsD* y *srtA* forman parte de unidades transcripcionales policistrónicas conservadas, por lo que es necesario realizar estudios enfocados a revelar qué estímulos ambientales y redes de interacción biológica están vinculados a la formación de biopelículas. A pesar de que los genes identificados presentan porcentajes de identidad superiores al 95 % entre subespecies, la posición genómica es altamente variable, lo que revela que los genomas estudiados son altamente dinámicos y pueden cambiar el repertorio de genes entre las diferentes cepas o linajes ambientales.

Independientemente de que las especies *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se han utilizado ampliamente en aplicaciones biotecnológicas e industria alimentaria, se dispone de información limitada sobre el mecanismo de regulación genética de formación de las biopelículas. Los análisis realizados demostraron que las especies de estudio contienen un factor de transcripción potencialmente vinculado con el control transcripcional de genes, cuyo producto son proteínas de biosíntesis de exopolisacáridos y otras enzimas fundamentales en la formación de biopelículas. Por lo tanto, se infiere que deben existir vías reguladoras mediadas por reguladores transcripcionales y condiciones ambientales que deben ser dilucidadas.

Los patrones de secuencia de ADN detectados río arriba de los operones vinculados a la formación de biopelículas demostraron ser estadísticamente significativos, los datos generados en este análisis pueden ser importantes para futuros protocolos experimentales. Los análisis de predicción de elementos reguladores en *cis* pueden identificar subconjunto de genes co-regulados inmerso en un subgrupo más extenso de genes co-expresados, lo que permitirá esclarecer el estado de la red reguladora y reconocer las señales ambientales a las que reacciona el microorganismo.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Alkema, W.B.L., Lenhard, B. y Wasserman, W.W. 2004. Regulog analysis: Detection of conserved regulatory networks across bacteria: Application to *Staphylococcus aureus*. Genome Res. 7:1362-1373.

Altschup, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. Vol. 215.

Baek, M.G., Kim, K.W. y Yi, H. 2023. Subspecies-level genome comparison of *Lactobacillus delbrueckii*. Sci Rep. 13(1).

Caggianiello, G., Kleerebezem, M. y Spano, G. 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 100:3877-3886.

Chen, C., Zhao, G., Chen, W. y Guo, B. 2015. Metabolism of fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST-III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. Appl Environ Microbiol. 81(22):7697-7707.

Sarduy Bermúdez, L. y González Díaz, M.E. 2016. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana Biofilm: a new conception of dentobacterial plaque. Medicentro electronica.Vol. 20.

Cuadros-Orellana, S., Martin-Cuadrado, A.B., Legault, B., D'Auria, G., Zhaxybayeva, O., Papke, R.T. y Rodriguez-Valera, F. 2007. Genomic plasticity in prokaryotes: The case of the square haloarchaeon. ISME Journal. 1(3):235-245.

De Angelis, M. y Gobbetti, M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. Proteomics. 4:106-122.

De Angelis, M., Siragusa, S., Campanella, D., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. 2015. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200. Proteomics. 15(13):2244-2257.

de Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R.D., Noiriel, A. y Hanson, A.D. 2007. Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: Predictions and validations. BMC Genomics. 23;8.

De Jesus, L.C.L., Aburjaile, F.F., Sousa, T.D.J., Felice, A.G., Soares, S.D.C., Alcantara, L.C.J. y De Carvalho, A.V.A. 2022. Genomic characterization of *Lactobacillus delbrueckii* strains with probiotics properties. Frontiers in Bioinformatics. 6;2.

De Jesus, L.C.L., Drumond, M.M., de Carvalho, A., Santos, S.S., Martins, F.S., Ferreira, Ê., Salgado, F.R., Do Carmo, F.L., Perez, P.F., Carvalho, A., Vascos, A., Mancha, A.P. 2019. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 in a model of 5 fluorouracil-induced intestinal mucositis. J Funct Foods. 53:197-207.

Defrance, M., Janky, R., Sand, O. y van Helden, J. 2008. Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences. Nat Protoc. 3(10):1589-1603.

El-Sayed, A., Aleya, L. y Kamel, M. 2021. Microbiota's role in health and diseases. Environmental science and pollution research international, 28(28), 36967-36983.

Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M. y Dubchak, I. 2004. VISTA: Computational tools for comparative genomics. Nucleic Acids Res. 1;32(WEB SERVER ISS.).

Giltner, C.L., Nguyen, Y. y Burrows, L.L. 2012. Type IV pilin proteins: Versatile molecular modules. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 76(4):740-772.

Guiton, P.S., Hung, C.S., Kline, K.A., Roth, R., Kau, A.L., Hayes, E., Heuser., Dodson, K.W., Caparon, M.G. y Hultgren, S.J. 2009. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus*

faecalis DNA-dependent biofilm development. Infect Immun. 77(9):3626-3638.

Hao, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Zhonghao, Y, Munehiro, O., Tomonobu, K., Shengyue, W., Xuan, L., Zai-Si, J. y Guoping, Z. 2011. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. PLoS One. 6(1).

Jones, S.E. y Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. BMC Microbiol. 9.

Lamothe, G., Jolly, L., Mollet, B. y Stingele, F. 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Arch Microbiol. 178(3):218-228.

Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., Campo, N., Chamot-Rooke, J., Le EL., Claverys, J.P. y Fronzes, R. 2013. A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog. 9(6).

Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L.P., Verhoeven, T.L.A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., De Vos, W.M., De Keersmaecker, S.C.J. y Vanderleyden, J. 2012. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol. 78(1):185-193.

Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Fadda, A.A., Marchal, K. y Vanderleyden, J. 2007. Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. J Bacteriol. 189(3):860-871.

Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. 2009. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. Appl Environ Microbiol. 75(11):3554-3563.

Malik, S., Petrova, M.I., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Busschaert, P., Vaneechoutte, M., Lievens, Bart., Lambrichts, I., Sienzen, R.J., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. 2013. The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain cmpg5300 is sortase dependent. Appl Environ Microbiol. 79(15):4576-4585.

Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccah, D., Vialettes, B. y Raoult, D. 2012. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. Int J Obes. 36(6):817-825.

Muscariello, L., Marino, C., Capri, U., Vastano, V., Marasco, R., Sacco, M. 2013. CcpA and three newly identified proteins are involved in biofilm development in *Lactobacillus plantarum*. J Basic Microbiol. 53(1):62-71.

Newman, J.A., Rodrigues, C. y Lewis, R.J. 2013. Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry. 12;288(15):10766-10778.

Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J.M., Péchoux, C., Meylheuc, T., Briandet, R., Juillard, V., Piard, J.C. 2012. Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. PLoS One. 6;7(12).

Oyeniran, A., Gyawali, R., Aljaloud, S.O., Krastanov, A. y Ibrahim, S.A. 2020. Probiotic characteristics and health benefits of the yogurt bacterium *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86939

Pessione, E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2:86.

Rizzello, C.G., De Angelis, M. 2011. Lactic acid bacteria *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus delbrueckii* Group. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition. 1;119-124.

Ronish, L.A., Lillehoj, E., Fields, J.K., Sundberg, E.J. y Piepenbrink, K.H. 2019. The structure of PilA from *Acinetobacter baumannii* AB5075 suggests a mechanism for functional specialization in Acinetobacter type IV pili. Journal of Biological Chemistry. 4;294(1):218-230.

Ruas-Madiedo, P. 2009. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. p. 279-310.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Ad` Rajandream, M.A. y Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation [Internet]. Vol. 16, BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE. Available from: http://www.acedb.org/

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M.F.R. y Ha, S.D. 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. Compr Rev Food Sci Food Saf. 14(4):491-509.

Santana-Garcia, W., Castro-Mondragon, J.A., Padilla-Gálvez, M., Nguyen, N.T.T., Elizondo-Salas, A., Ksouri, N., Gerbes, F., Thieffry, D., Vincens, P., Contrras-Moreira, B., Helden, J.V., Thomas-Chollier, M. y Medina-Rivera, A. 2022. RSAT 2022: regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 5;50(W1): W670-676.

Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F. y Gänzle, M.G. 2007. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. Syst Appl Microbiol. 10;30(6):433-443.

Sheppard, D., Berry, J.L., Denise, R., Rocha, E.P.C. y Matthews, S. 2020. Pelicic V. The major subunit of widespread competence pili exhibits a novel and conserved type IV pilin fold. Journal of Biological Chemistry. 8;295(19):6594-5604.

Suzzi, G., Sidari, R., Reinheimer, J., Liu, F., Huo, G. y Evivie, S.E. 2020. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS 1.0207 exerts antimicrobial and cytotoxic effects *in vitro* and improves blood biochemical parameters *in vivo* against notable foodborne pathogens. Available from: www.frontiersin.org

Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R. y Merino, E. 2018. Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. Bioinformatics. 1;34(23):4118-4120.

Tieking, M. y Gänzle, M.G. 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated Lactobacilli. In: Trends in Food Science and Technology. 79-84.

Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, M.G. y Tannock, G.W. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. Microbiology. 154(1):72-80.

Wen, Z.T., Baker, H.V. y Burne, R.A. 2006. Influence of BrpA on critical virulence attributes of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 188(8):2983-2992.

Windsor, A.J. y Mitchell-Olds, T. 2006. Comparative genomics as a tool for gene discovery. Current Opinion in Biotechnology. 17:161-7.

Wittkopp, P.J. y Kalay, G. 2012. Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. Nature Reviews Genetics. 13:59-69.

Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J. 2004. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. Theoretical and Applied Genetics. 109(8):1677-1686.

Zeidan, A.A., Poulsen, V.K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P.M.F., Øregaard, G. y Neves, A.R. 2017. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. FEMS Microbiology Reviews. 47.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Induction of effective microorganisms (EM) in the fermenting mass of cacao (*Theobroma cacao* L.) and their impact on physicochemical and antioxidant characteristics

Inducción de microorganismos eficaces (ME) en la masa fermentativa del cacao (*Theobroma cacao* L.) y su incidencia las características físico química y antioxidante.

Frank Intriago Flor[1], Jossenka Cedeño Loor[1], Carlos Parraga Muñoz[1], Kerly Alvarado Vásquez[2]*, Luis Vásquez Cortez[2], Karol Revilla Escobar[2], Jhonnatan Aldas Morejon[2]

[1] Facultad de Agrociencias Universidad Técnica de Manabí.
[2] Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, ICAI-CONICET.

ABSTRACT

This research evaluated the impact of effective microorganisms (EM) on cacao fermentation and their influence on its physical, chemical, and antioxidant characteristics. A completely randomized statistical design with two factors —type of fermentation (jute sack or wooden boxes) and EM concentration (1 %, 3 %, and 5 %)— was used over six fermentation intervals (0, 24, 48, 72, 94, and 120 h). Parameters analyzed included temperature, pH, °Brix, and grain weight. Results showed significant impact from EM application. The highest phenol content (24.17 g GAE/100g) was observed with 3 % EM in boxes. Antioxidant capacity was highest with 5 % EM in jute sacks (ABTS method) and 3 % EM in sacks (DPPH method, 184.01 µmol Trolox Equivalent/g). Optimal fermentation was achieved with 5 % EM in boxes and 1 % EM in sacks, yielding quality values of 79 % and 85 %, respectively. Instrumental color analysis showed no significant differences. EM inclusion positively affected cacao grain quality, enhancing its physical, chemical, and antioxidant properties, though results varied with EM concentration and fermentation type.

Keywords: Cacao, antioxidant capacity, phenols, effective microorganisms.

RESUMEN

Esta investigación evaluó el impacto de los microorganismos efectivos (ME) en la fermentación del cacao y su influencia en sus características físicas, químicas y antioxidantes. Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado con dos factores: tipo de fermentación (saco de yute o cajas de madera) y concentración de ME (1 %, 3 % y 5 %), durante seis intervalos de fermentación (0, 24, 48, 72, 94 y 120 h). Los parámetros analizados incluyeron temperatura, pH, °Brix y peso del grano. Los resultados mostraron un impacto significativo de la aplicación de ME. El mayor contenido de fenoles (24.17 g GAE/100g) se observó con 3 % de ME en cajas. La capacidad antioxidante fue mayor con 5% de ME en sacos de yute (método ABTS) y 3 % de ME en sacos (método DPPH, 184.01 µmol Equivalente Trolox/g). La fermentación óptima se logró con 5 % de ME en cajas y 1 % de ME en sacos, obteniendo valores de calidad del 79 % y 85 %, respectivamente. El análisis de color instrumental no mostró diferencias significativas. La inclusión de ME en la fermentación del cacao afectó positivamente la calidad del grano, mejorando sus propiedades físicas, químicas y antioxidantes, aunque los resultados variaron según la concentración de ME y el tipo de fermentación.

Palabras clave: cacao, capacidad antioxidante, fenoles, microorganismos eficientes.

INTRODUCTION

The cocoa, scientifically called theobroma which in Greek is interpreted as "food of the gods", is native to America. Historical compilations indicate that the Mayans cultivated it, and the pepa was used as currency (Quevedo *et al*., 2018). In South America there are cocoa varietals within the region, where countries such as Ecuador, Brazil, Peru, Colombia and Venezuela stand out. Ecuador and Peru are recognized for the best bean and for the fine aroma cocoa (Alvarado *et al*., 2022).

In 2014, world production of cocoa (*Theobroma cacao* L.) reached 4.45 million tons. More than 70% of the world's production of fine aroma cocoa is sourced in Ecuador, making it the largest producer of the superior quality product. In addition, it is a source of income and employment as it is the fifth most exported product (from non-oil exports) by the country (ANECACAO, 2014). The year 2014 was a critical year for cocoa production in Ecuador, since this sector was hit hard by pest problems and other alterations caused by climatic phenomena that led to high rainfall (Intriago *et al*., 2023).

The distribution of cocoa in Ecuador, both the planted area and the production, is concentrated in the province of Guayas, the rest is distributed in the provinces of Los Ríos, Cantar, Manabí and Esmeraldas. National cocoa is considered unique in the world, its recognition is based on its short fermentation, resulting in a chocolate with a good aroma and smooth flavor, simply our National Cocoa is recognized with the classification of Fine Aroma Cocoa (Erazo *et al*., 2023).

In Ecuador, the cocoa bean is fermented for chocolate production using fermenting crates of various materials, such as: wooden boxes, plastic, and cabuya sacks. In this context, the trial carried out in Ecuador with National cocoa is taken as

*Author for correspondence: Kerly Alvarado Vásquez
e-mail: kalvarado6940@utm.edu.ec
Received: August 24., 2024
Accepted: October 25, 2024
Published: November 27, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2422

a reference in both nations, from which a higher percentage of cocoa beans fermented in wooden boxes was obtained, compared to those fermented in plastic boxes; likewise, there is a lower percentage of violet cocoa beans in wooden boxes and a higher percentage in plastic boxes. Another way to ferment the bean is by means of the heap technique, known as mounds of cocoa beans placed on an open surface and covered with leaves. Similarly, the technique applied with cabuya sacks is known, which consists of placing the cocoa beans inside the bag and letting them ferment for an estimated time (Jaimez *et al*., 2022).

Efficient microorganisms (EM) consist of liquid formulated products that contain more than 80 species of microorganisms, some species are aerobic, anaerobic and even photosynthetic species whose main achievement is that they can coexist as microbial communities and can even be completed. EMs have shown beneficial effects for sewage treatment, reduction of bad odors, production of agrochemical-free food, the management of solid and liquid waste generated by agricultural production, the food processing industry, paper mills, slaughterhouses, and municipalities, among others (Morejon *et al*., 2022).

For what has been described above, the objective of the research was to use efficient microorganisms (EM) in the fermentation of cocoa and determine their effect on the physical, chemical and sensory composition of organic cocoa (*Theobroma cacao* L.).

MATERIAL AND METHODS

The research was carried out on the premises of the Fruit and Vegetable Laboratory of the Faculty of Zootechnical Sciences of the Technical University of Manabí, geographically located at the coordinate South latitude 0°41′ and 17″, West longitude 80° 7′ 25.60″. The collection of the grains was carried out at the "Finca Adelaida", located on Jordán de Mosquito Street, in Sitio San Andrés, Chone canton, with the following coordinates: S 0° 40′ 2.541740″ and W 80° 2′ 26.704981″.

Research design

An investigation was carried out with a Completely Random Two-Factor Statistical Design, in the InfoStat statistical program free version, where the effects of two factors in the cocoa fermentation process were studied. The factors were type of fermentation (jute bags and wooden crates) as Factor A, and concentration of microorganisms (1 %, 3 % and 5 %) as Factor B. Three replicates were carried out for each treatment. The microorganisms used were acquired from the company EMBIOECSA S.A.

The following variables were evaluated:

Fermentation in jute bags

50 cm x 50 cm jute sacks were used to ferment the cocoa beans after manual harvesting and separation of the cobs (Rivera *et al*., 2012).

Fermentation in wooden bags

Wooden crates (Cedar) of 20 cm x 20 cm x 20 cm with holes in the bottom were used for the fermentation of the grains (Alvarado *et al*., 2024).

Fermentation time

Fermentations were carried out for 0, 24, 48, 72, 94 and 120 hours, with manual turning and removal of the grains to homogenize the temperature and aeration (Vera *et al*., 2022).

Chemical evaluation of cocoa beans

The pH was measured using a potentiometer after sample preparation. The °Brix was determined with a digital brixometer (brand: Atago, model: PAL-1, country: Japan), utilizing 5 grams of the sample. The temperature was measured with a tip thermometer (Lanza *et al*., 2021).

Grain weight

They were weighed before and after each fermentation stage with a 30 kg digital scale (Mora *et al*., 2021).

Phenolic content of cocoa beans

To measure the total phenolic content, the Agilent Technologies spectrophotometer, model Cary 60 UV-Vis, manufactured in the United States, was used. A 200 µL aliquot of the sample was taken, to which 1.5 mL of distilled water and 100 µL of the Folin-Ciocalteu reagent were added. Subsequently, 200 µL of 20 % sodium carbonate were incorporated, and the mixture was allowed to stand for 30 min in the dark. Finally, the absorbance was measured at 725 nm, and the total phenolic content present in the sample was calculated using these data.

Antioxidant capacity of cocoa samples

It was evaluated using the ABTS and DPPH methods. The sample was dehydrated and pulverized, an aqueous extract was prepared, and the antioxidant capacity in TEAC (Trolox equivalent to antioxidant capacity) was quantified by constructing a standard curve.

Evaluation of the physical parameters of cocoa beans

It was carried out with the objective of knowing the amount of well-fermented, medium-fermented almonds, violets and slates as a result of the cocoa fermentation, which were evaluated in accordance with the NTE INEN 176 standard (INEN, 2018) (Perea *et al*., 2019).

Colorimetric evaluation of cocoa beans

The colorimetric evaluation of the cocoa beans, for this a digital colorimetric equipment HunterLab ColorFlex EZ, manufactured in the United States. This evaluation focused on measuring L* = luminosity were evaluated; a* coordinate = red/green coordinates (+a indicates red, -a indicates green) and b* coordinate = yellow/blue coordinates (+b indicates yellow, -b indicates blue). This parameter was measured at the end of the research.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the efficient microorganisms (EM) concentration on cocoa fermentative mass

Data from 100 cocoa pods revealed an average of 22.87 cm long, 10.33 cm wide, and an average weight of 147.87 g. The corn/seed ratio had an average of 35.62. Previous studies support the positive influence of efficient microorganisms on cocoa growth (Vera *et al*., 2023).

Sánchez *et al*. (2020) when studying the agronomic behavior of the cocoa fruit, found a significant behavior (p>0.05) when supplying efficient microorganisms in the cocoa plantation, reaching values of 11.65 cm in control treatment and 22.24 cm when supplying 6 l/ha, describing the importance of this type of microorganisms on productive yields and on the ecosystem. In this context, the results presented by Vera *et al*. (2022) show a weight per cob of 146 g per cob, results that are within those reported in the research.

After the second day, statistical differences (p ≤ 0.05) were observed between treatments with 3 % and 5 % EM in crates and control treatments in bags and wood, with an average temperature of 39.67 °C. On the third day, the treatments in drawers outperformed those in bags (40 - 41 °C). This effect could be related to the external temperature. According to Castillo and Machacuay (2019), cocoa fermentation involves microbial succession influenced by acetic bacteria and aeration of the beans.

According to Mite *et al*. (2010) during the fermentation process of cocoa beans, there is a microbial succession, where different microorganisms intervene, including acetic bacteria that have the ability to metabolize the alcohol generated in fermentation, mentioning that this biochemical reaction occurs during exothermic fermentation which in turn is influenced by the removal of the beans, in which the aeration of the grains is generated and with it the correct development of fermentative bacteria.

These results are close to those reported by Chancay *et al*. (2022), when evaluating the fermentation temperature of Criollo cacao (*Theobroma cacao* L.) under eco-efficient systems (Semicylindrical, square and rectangular) obtained higher values on the third day, documenting averages that ranged from 30 °C to 48 °C, indicating that these values are within the appropriate ranges.

Neira *et al*. (2020), highlights that when comparing the pH and temperature of Nacional cocoa in the fermenter, it is on the rise while the temperature fluctuates due to the consortium of microorganisms and their activity of production of secondary metabolites such as alcohols, ethers, phenols, furans, esters, aldehydes, ketones, among others, precursors of the flavor and aroma of chocolate (Portillo *et al*., 2017).

The pH of the treatments varied significantly (p ≤ 0.05) during fermentation. The initial values were similar (between 3.66 and 3.71), but then fluctuated. Treatments with 3 % and 5 % EM in crates had decreases to 3.63 and 3.66, while in bags, control treatments and 1 % EM showed fermentative activity with values of 4.27 and 4.37. Subsequently, all treatments maintained pH values above 5.04. The inclusion of EM improved fermentation, with pH values of 6.10 in crates and 6.07 in bags with 5 % EM. These results coincide with the optimal pH range for quality cocoa.

The decrease in pH was reported until day 2 in the treatments that included 3 and 5 % EM in box fermenters, which showed a decrease reaching values of 3.63 and 3.66 %, while fermentation in bags showed a greater fermentative activity in the treatments that controlled and with the inclusion of 1 % of EM with values of 4.27 and 4.37. Aguilar (2016), comments that these variations in pH allow the increase of acetic acid and biochemical reactions of the proteins diffused through

Table 1. Characterization of the national cocoa pods.
Tabla 1. Caracterización de las mazorcas de cacao nacional.

Parameters	Stocking	E.E.M.
Length (cm)	22.87	±3.28
Width (cm)	10.33	±0.88
Cobs-Seeds	35.62	±10.46
Weight (g)	147.87	±47.02

Means with a common letter in the same column are not statistically different (p ≤0.05).

Table 2. Temperature in degrees Celsius of the beans during fermentation.
Tabla 2. Temperatura en grados centígrados de los granos durante la fermentación.

Method of fermentation	Tra	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Drawer	0	37.6 to	37.6 to	38.0 b	41.0 to	39.0 to	38.7 to
	5%.	36.6 to	37.6 to	39.6 to	40.6 to	38.0 b	37.7 to
	3%.	37.0 to	37.3 to	39.6 to	40.0 to	38.3 b	38.3 to
	1%.	37.3 to	37.3 to	39.0b	40.3 to	38.7ab	38.7 to
Sack	0	37.3 to	38.0 to	38.0 b	37.6 b	37.3 b	38.0 to
	5%.	37.7 to	37.7 to	38.0 b	38.0 b	37.7ab	38.3 to
	3%.	37.3 to	37.0 to	37.7 b	37.3 b	37.7ab	38.3 to
	1%.	36.6 to	37.6a	38.3 b	37.3 b	37.7ab	37.7 to
P-Value		0.2025	0.3985	0.0010	<0.001	0.010	0.3934
E.E.		0.31	0.29	0.31	0.33	0.29	0.37

Means with a common letter in the same column are not statistically different (p ≤ 0.05).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.

Table 3. pH of the beans during fermentation.
Tabla 3. pH de los granos durante la fermentación.

Fermentation Method	Tra	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Drawer	0	4.1 to	4.0 to	4.2 ab	3.9 c	5.5 to	5.1 ab
	5%.	3.6 c	3.9 to	3.6 b	3.9 c	5.7 to	6.1 to
	3%.	3.6 c	3.9 to	3.6 b	3.9 c	5.7 to	5.7 ab
	1%.	3.6 c	4.0 to	3.8 ab	4.4 bc	5.3 to	5.8 ab
Sack	0	3.8 b	4.2 to	4.2 to	5.6 to	5.5 to	4.9 b
	5%.	3.7 c	4.0 to	3.9 ab	4.9 abc	5.9 to	6.0 to
	3%.	3.7 c	4.0 to	4.0 ab	5.0 ab	5.9 to	5.0 b
	1%.	3.7 c	4.0 to	4.3 ab	4.7 abc	5.7 to	5.4 ab
P-Value		<0.001	0.291	0.068	0.003	0.383	0.003
E.E.M.		0.02	0.08	0.13	0.22	0.18	0.20

Means with a common letter in the same column are not statistically different (p ≤ 0.05).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.

Table 4. °Brix of cocoa beans during fermentation.
Tabla 4. °Brix de los granos de cacao durante la fermentación.

Method of fermentation	Trat.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Drawer	0	16.2 to	9.9 to	6.5 to	5.1 bc	4.7 c	7.2 bc
	5%.	8.8 bc	5.9 b	4.4 b	5.3 ab	6.6 ab	5.6 c
	3%.	8.5 bc	6.0 b	4.3 b	5.4 ab	6.8 ab	8.2 ab
	1%.	8.8bc	6.3 b	4.8 b	4.5 c	4.7 c	8.3 ab
Sack	0	16.2 to	9.5 to	7.1 to	6.0 to	4.9 c	9.7 to
	5%.	7.6 c	5.3 b	4.6 b	5.5 ab	6.4 ab	5.8 c
	3%.	9.7 b	5.4 b	5.2 b	4.7 bc	7.5 to	6.8 bc
	1%.	8.2 bc	5.6 b	4.7 b	5.6 ab	5.8 bc	6.8 bc
P-Value		<0.0001	0.0001	0.0002	0.0212	0.0011	<0.0001
E.E.M.		0.36	0.57	0.35	0.27	0.43	0.38

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).

the head, by the increase in temperature in fermentation, causing the death of the grain due to the formation of a hard crust that prevents the exit of acetic acid. which causes the cocoa to have greater acidity; in this case the author mentions that until 48 h the pH content was higher than 5.00, however, after 72 h there is a decrease in pH of the cocoa with values below 5.00.

Quintana and Aguilar (2018), mentions that optimal pH for quality cocoa should be between 4.75 and 5.5, which are considered values that lead to an increase in the aromatic potential of the beans, however, these values can be influenced by the variety and type of cocoa. In this case, it can be seen that these values were presented when fermentation was applied in bags during day 3, however, after day 4 the results were statistically equal ($p \leq 0.05$) in each of the treatments studied, maintaining higher values of 5.04 and 6.10 until the fifth day, with the exception of the control treatment with fermentation in bags where a pH of 4.98 was observed, as the lowest, in accordance with what was stated by Mesa *et al*. (2022), who mentions that after four days the pH value should oscillate in a range of 4.85 - 5.0.

The °Brix content in the cocoa beans varied significantly during fermentation, with higher values on day zero in the control treatments. Then, there was a steady decrease until the second day, followed by an increase in efficient microorganism treatments on the third day. These results are consistent with previous studies that attribute the decrease in °Brix to the fermentation and degradation of mucilage sugars by microorganisms.

Similar behavior is reported by Alvarado *et al*. (2024), when evaluating the variation of total soluble solids (°Brix -Bx-) during fermentation in a period of 40 hours, a downward behavior was obtained as the days went by, documenting initial values of 19 Bx and final values that ranged between 7 and 11 Bx, between the treatments under study, describing that this behavior is due to the fact that the anaerobic phase is much larger. This favours the degradation of the sugars in the mucilage by the action of yeasts.

During the third day, the treatments that included the three EM concentrations with the two fermentation methods showed as a result an increase in the Bx content until the fifth day, reaching a superiority in the control treatment in bags with a total of 9.73, which is similar to the treatments that included 1 and 3% in box fermentation with averages of 8.30 and 8.27 Bx.

Results presented by Baroni *et al*. (2019), when evaluating the content of brix degrees during the pre-drying of white almond cocoa during nine hours of fermentation, documents as initial results of 20.16 Bx, which presented a decrease of 13.77 Bx, which differ from the results obtained in the research. This decrease is due to the fact that the presence of mucilage is reduced due to the presence of microorganisms that use the substrate for the fermentation of the grain.

In the study, the weight of cocoa showed significant differences ($p \leq 0.05$) on days 1, 3, 4 and 5. On day 2 there were no significant differences in the morning. At the end of the study, treatment with 5 % EM in drawers showed the least weight loss (368 g), while treatments with 5 % and 1 % EM lost more weight (329.67 and 329.33 g). These results are consistent with previous studies that report similar yields in crate and bag fermentations.

Gutierrez and Andrade *et al*. (2019), when evaluating the fermentation process in criollo cocoa through the application of two fermentation methods (bag and box), obtained a yield of 68 % in the fermentation in boxes with an initial mass of 12000 g and a final mass of 8000 g, while for the fermentation in bags a yield of 69 % was obtained, documenting an initial weight of 15000 g and final mass of 10000 g.

Table 6 shows that during the second and fifth days there were no significant differences ($p \leq 0.05$) in grain weight between treatments. However, on days 1, 3, and 4, significant differences were observed. Box fermentation resulted in less weight loss compared to bag fermentation, with averages of 365 g to 374 g vs. 337 g to 352 g.

Gutierrez and Andrade *et al*. (2019), describe that during the first days there is a greater weight loss of the beans, due to the draining of the juice by a process of hydrolysis and fermentation of the sugars of the mucilage and the cotyledons of the cocoa seeds.

Table 5. Weight of cocoa beans during the morning.
Tabla 5.. Peso de los granos de cacao durante la mañana.

Method of fermentation	Tra	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Drawer	0	766.0 ab	503.3a	432.3 to	392.0 A	366.0 ab
	5%.	799.7 to	477.0a	415.7 ABC	396.3 to	368.0 to
	3%.	800.3 to	477.0a	415.0 ABC	386.0 ab	358.3 bc
	1%.	798.7 A	481.0a	421.3 ab	381.0 abc	366.0 ab
Sack	0	717.7 b	471.3a	395.0 bc	361.0 bcd	342.0 ABC
	5%.	721.3 b	453.7a	390.7 bc	345.0 d	329.6 c
	3%.	727.0 b	447.7a	384.3 c	351.6 cd	336.0 bc
	1%.	738.0ab	453.0a	390.3 bc	348.0 d	329.3 c
P-Value		0.0461	0.4690	0.0548	0.0043	0.0229
E.E.M.		22.42	18.50	10.96	9.53	9.32

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.

Table 6. . Weight of cocoa beans during the afternoon.
Tabla 6 . Peso de los granos de cacao durante la tarde.

Method	Trat.	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Drawer	0	544.7 ABC	450.7 to	412.7 to	372.3 to	319.0 to
	5%.	579.0 to	433.3 to	404.7 ab	373.7 to	326.0 A
	3%.	559.0 ab	430.0 A	406.3 ab	365.0 ab	302.3 to
	1%.	512.3 bc	437.3 to	398.0 abc	374.3 to	311.3 to
Sack	0	546.7 ABC	414.7 to	378.3 bcd	352.0 ab	312.0 to
	5%.	512.0 bc	407.7 to	365.0 d	337.7 b	300.3 to
	3%.	546.7abc	403.0 to	370.3 cd	343.7 ab	306.3 A
	1%.	502.0 c	414.3 to	369.7 cd	337.7 b	300.7 to
P-Value		0.0391	0.1017	0.0116	0.0309	0.5839
E.EM.		15.74	11.33	9.76	9.26	10.17

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.

Umaña (2015), when evaluating the loss of weight of cocoa during the fermentation process of the beans, obtained as results that the fermenting mass loses between 30 and 35% of its initial weight, in this case an initial weight of 9.78 kg and a final weight of 6.13 kg are described.

Antioxidant activity of cocoa beans induced with effective microorganisms by two fermentation techniques

The fermentation of cocoa in jute bags favors a higher phenol content due to its better ventilation and humidity regulation, which enhances the activity of microorganisms and the enzymatic action released by these compounds. Using moderate concentrations of EMs, such as 3 %, in jute bags optimizes phenol production, while higher concentrations in fermenter boxes can reduce phenols due to lack of oxygenation. The highest value of 24.27 g EAG/100g corresponded to the use of EM (fermentation in jute bags). The treatments in crates had a lower amount of phenols, varying between 2.67 and 4.16 g EAG/100 g, with a tendency to decrease with the concentration of efficient microorganisms.

Sosa *et al*. (2017) and other previous studies highlight the importance of the type of fermentation, the selection of microorganisms and the oxidation time to obtain higher levels of phenols in fermented cocoa states that, when evaluating

Table 7. Phenolic composition of the treatments under study.
Tabla 7. Composición fenólica de los tratamientos en estudio.

Fermentation Method	Trat.	Phenolic content g EAG/100g
Drawer	Control	4.16 c
	5%	2.67 c
	3%	3.54 C
	1%	5.21 c
Sacks	Control	14.79 b
	5%	16.71 b
	3%	24.17 to
	1%	19.05 b
P-Value		<0.0001
E.E.M.		1.02

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.

Table 8. Physical characterization of cocoa beans by applying two fermentation methods.
Tabla 8. Caracterización física de los granos de cacao mediante la aplicación de dos métodos de fermentación.

Drawer	Trat.	Almonds well fermented	Moderately fermented almonds	Violet almonds	Slate almonds	Moldy almonds	Infested Almond	Cocoa cataloguing
Drawer	0	60.6 c	15.0 ab	18.3a	0.0 to	6.0 b	0,0	A.A.S
	5%.	79.0a	7.6 bc	13.3 to	0.0 to	0.0 c	0,0	A.S.S.S
	3%.	64.0bc	21.0 to	18.3 to	0.0 to	0.0 c	0,0	A.A.S
	1%.	76.67 AB	11.7 bc	11.7 to	0.0 to	0.0 c	0,0	A.S.S.S
Sack	0	76.6 ab	5.6 c	9.0 to	0.0 to	8.7 to	0,0	A.S.S.P.S
	5%.	73.0abc	14.0 ab	11.3 to	1.6 to	0.0 c	0,0	A.S.S.S
	3%.	75.7 AB	12.7 bc	11.7 to	0.0 to	0.0 c	0,0	A.S.S.S
	1%.	85.0 to	11.3 bc	3.6 to	0.0 to	0.0 c	0,0	A.S.S.S
P-Value		0.0215	0.0131	0.0893	0.4663	<0.0001	-	-
E.E.		4.34	2.40	3.22	0.59	0.75	-	-

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).
CV = Coefficient of variation; EEM = Standard error of the mean.
A.S.S.P.S: Top Superior Summer Select Plantation.
A.S.S.S: Top Superior Summer Select.
A.A.S: Top Superior Select.
A.S.N: Arriba Superior Navidad.
A.S.E: Upper Epoch.

the presence of total polyphenols analyzed in the cotyledon and husk of cocoa beans, he describes as results values that ranged between 6.08 and 5.18 g EAG/100 g, however, it is noteworthy that the inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* at 1 % w/w presented a better proportion of polyphenols.

Torres and Torres (2024) , when studying the presence of polyphenols in cocoa fermentation by applying different fermentation methods, obtained results that the national variety has a higher percentage of polyphenols regardless of the type of fermenter used, indicating that this parameter is directly influenced due to the fermentation time, because polyphenols undergo oxidation processes and decrease due to diffusion. In this case, a total of 53.24 mg of gallic acid/g of defatted cocoa in the national variety and 42.36 mg of gallic acid/g of defatted cocoa in the CCN-51 variety are documented.

Identification, through physical and instrumental analysis, of the variations existing in the two fermentative techniques in the cocoa bean, applying the requirements of the INEN 176 standard (2018-02)

The results of the physical characterization of the cocoa beans showed significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatments under study in the parameters of well- and moderately-fermented almonds, and moldy almonds. In this case, the results of the percentage of fermented almonds were

higher results in the treatments with fermentation in bags with 1 % and in boxes with 5 % of the efficient microorganisms with averages of 85 and 79 %, respectively.

On the other hand, Dubón (2016) when carrying out a cutting test of fermented almonds of hybrid and national cocoa varieties, obtained a higher percentage of fermented beans in the national variety with a value of 77.75 %, a total of 21 violet beans and 0.50 in slate beans. On the other hand, Mite *et al*. (2010) when using two types of yeasts, a BAL (lactic acid bacteria) and a LAB, obtained the results that up to 120 hours the average fermentation was 81.82 %, with a pH of 4.71.

The content of moderately fermented almonds was lower in the control treatment whose fermentation took place in bags where a percentage of 5.67 % was obtained, close to that reported with the inclusion of 5 % of the microorganisms in the fermentation in crates where a total of 7.67 % can be seen, however, for the treatment with 3 % in the same fermentation method, a greater numerical difference was obtained with a total of 21.00 %.

The content of violet almonds did not show significant differences ($p \leq 0.05$) between the average values recorded in each of the treatments, however, it is important to note that fermentation in crates showed a slight tendency to an increase in violet beans with values of 11.67 to 18.33. Morejon *et al*. (2022), when analyzing the physical properties of dried cocoa beans, mentions that the lower percentage of fermented almonds increases the amount of violet and slate almonds, which is why it can be deduced that the right time and temperature have not been reached for biochemical changes, embryo death, and change from violet to brown color to occur (Alvarado *et al*., 2022). In this case, the author documents a violet grain content of 8 to 16 grains, slate grains 4 to 12 and the absence of moldy grains.

In accordance with the requirements of the Ecuadorian Technical Standard INEN 176 in Ecuador, the results obtained in fermentation in bags and crates are within the parameters described in the standard, in the same way the percentage of violet grains, slate and molds meet the requirements of the INEN standard (INEN, 2018). Acceptance of the control treatments (bag and drawer) where a content of 6 and 7 moldy grains can be appreciated. In this case, the categorization of cocoa beans shows a superiority in the control treatment and with the inclusion of 1 % of EM in bags where a categorization of Arriba Superior Summer Plantation Select (A.S.S.P.S) was obtained.

Table 9. Colorimetric evaluation of the treatments under study.
Tabla 9. Evaluación colorimétrica de los tratamientos en estudio.

Drawer	Trat.	L	to*	b*
Drawer	Control	1.92 to	37.50 to	15.94 to
	5%.	0.00 to	37.24 to	10.19 to
	3%.	0.00 to	37.64 to	9.61 to
	1%.	0.00 to	37.39 to	9.90 to
Sack	Control	0.00 to	37.15 to	9.22 to
	5%.	0.00 to	37.05 to	9.17 to
	3%.	0.00 to	37.00 to	9.52 to
	1%.	0.00 to	36.88 to	9.62 to
P-Value		0.4396	0.9721	0.3638
E.E.M.		0.68	0.51	2.14

Means with a common letter in the same column are not statistically different ($p \leq 0.05$).
CV = Coefficient of variation; EEM= Standard error of the mean.

Mora *et al*. (2021), indicates that the variations between the characteristics of fermented grains can be influenced by the temperature exchanges generated by the removal of the grains, leading to the development of very high acidity. Morales *et al*. (2012), when analyzing the physical parameters of cocoa beans of the CCN51 variety (*Theobroma cacao* L.), obtained as results a total of 6 violet beans, 33 partially violet beans, and the absence of moldy and slate beans.

CONCLUSIONS

The inclusion of efficient microorganisms (EM) in cocoa fermentation had a significant impact ($p \leq 0.05$) on temperature, pH and °Brix content during the five days of fermentation. In addition, it influenced grain weight loss, with less loss in treatment with 5 % EM in drawers in the morning (368 g), although no significant differences were found ($p > 0.05$) in the afternoon of the fifth day. In terms of phenolic content, fermented treatments in bags stood out, especially with 3 % EM, reaching 24.17 g EAG/100g. The antioxidant capacity was higher in the fermented treatments in bags with 5 % DM (240 µmol Equivalent to Trolox/g of cocoa by ABTS) and with 3 % of DM (184.01 µmol Equivalent to Trolox/g of cocoa by DPPH).

Physical analysis showed that treatments with 5 % EM in crates and 1% EM in bags achieved the highest percentage of fermented almonds, with values of 79 % and 85 %, respectively. The control treatment in bags had the lowest percentage of moderately fermented almonds (5.67 %) and the treatment with 1 % of EM showed the lowest content of violet almonds (3.67 %). Only the control treatments of both fermentation methods presented almonds with molds, without finding infested almonds. In terms of quality, the control treatment and the one that included 1 % EM in bags obtained the classification of Arriba Superior Summer Plantation Selecta (A.S.S.P.S). The instrumental color analysis did not show significant differences between the treatments, highlighting a greater fixation of the red (+a*) and yellow (+b*) tones.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Aguilar, H. 2016. Manual para la evaluación de la calidad del grano de cacao. 12-14. http://www.fhia.org.hn/dowloads/cacao_pdfs/Manual_para_la_Evaluacion_de_la_Calidad_del_Grano_de_Cacao.pdf

Alvarado, K., Rivadeneira, C. and Intriago, F. 2024. Utilización de extracto natural del Muicle (*Justicia spicigera*) en la elaboración de chocolate a partir de dos variedades de

cacao (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. y *Theobroma cacao L.)*. ¿Revista? *4*(1), 1-19. https://doi.org/10.51252/raa.v4i1.6

Alvarado, K., Vera, J., Tuarez, D. and Intriago, F.(022). Fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L .) con adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzima (PPO´s) en la disminución de metales. *Centrosur*, *2014*(1), 24. https://centrosuragraria.com/index.php/revista/article/view/191/399

Andrade, J., Rivera García, J., Chire Fajardo, G. and Ureña Peralta, M. 2019. Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. In *Enfoque UTE* (Vol. 10, Issue 4). Universidad UTE. http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422019000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

ANECACAO. 2014. Actualidad y perspectivas del sector cacaotero en Ecuador. 26.

Baroni, M.V., Calandri, E., Di Paola Naranjo, R., Martínez, M. and Moiraghi, M. 2019. Análisis fisico-quimícos y sensoriales. In *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. ¿Fuente?

Castillo, J. and Machacuay, J. 2019. Diseño de un fermentador orientado a mejorar el proceso de fermentación del cacao criollo blanco de Piura. Universidad de Piura. ¿Fuente?

Chancay, L.F., Delgado Demera, M. and Salas Macías, C.A. 2022. Cadmio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus efectos ambientales. *La Técnica: Revista de Las Agrociencias. ISSN 2477-8982*, 91. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i0.4324

Erazo, C., Vera, J., Tuarez, D., Vásquez, L., Alvarado, K., Zambrano, C., Mindiola, K., Mora, R. and Revilla, K. 2023. Phenotypical characterization of Cocoa flowers (*Theobroma cacao* l.) in 40 experimental hybrids at La Represa experimental farm. *Bionatura*, *8*(3), 1-16. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.11

Giancarlo. 2021. Optimización del tiempo y temperatura de infusión de cascarilla de cacao en el contenido teobromina, polifenoles y actividad antioxidante. Universidad Nacional del Centro del Perú.

INEN. 2018. Granos de cacao. Requisitos NTE INEN 176. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, *5*, 1-8.

Intriago, F., Macías, M., Napa, B., Vásquez, L., Alvarado, K., Revilla, K., Aldas, J. and Vera, J. 2023. Inclusión de mucílago de cacao (*Theobroma cacao*) como estabilizante en néctar de jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Agroindustrial Science*, *13*(2), 75-81. https://doi.org/https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2023.02.03

Jaimez, R.E., Barragan, L. and Fernández-Niño, M. 2022. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51 : a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *Plant Biology*, *6*(12), 1-20.

Lanza, J., Churión, P., Liendo, N. and López, V. 2021. Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Santa Bárbara de Zulia, Venezuela. *Multidisciplinaria Del Consejo de Investigación de La Universidad Del Oriente*, *28*(1), 106-115. https://www.redalyc.org/pdf/4277/427746276012.pdf

León, A., Rosati, V. and Tonetti, G. 2022. Evaluación de la capacidad antioxidante de diferentes extractos de Cannabis sativa. ¿Fuente?

Mesa, G., Contrera, P., Quintana, G., Castro, H., González Mesa, O., Gómez Quintana, I. and Hidalgo Castro, Y. 2022. La cadena de valor como una herramienta de gestión para la producción de arroz consumo *The value chain as a management tool for the production of consumer rice A cadeia de valor como ferramenta de gestão para a produção de arroz para consumo*. *10*(1), 2310-2340.

Mite, F., Carrillo, M. and Durando, W. 2010. Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de ecuador. *Xii Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, *November*, 17-19.

Mora, C., Quevedo Guerrero, J., Zhiminaicela Cabrera, J., Herrera Reyes, S., Morocho Castillo, A. and León Toro, J. 2021. Influencia de la madurez de las mazorcas de cacao: calidad nutricional y sensorial del cultivar CCN51. *Ciencias Químicas*, *October*, 26-40. https://doi.org/10.33936/rev

Morejon, R., Vera, J., Salgado, I., Flores, C. and Morejon, M. 2022. Use of enzymes and leavening agents as a strategy to reduce the presence of cadmium in the fermentation process of *Theobroma cacao* L . almonds. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, *13*(3), 604-614. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.03.089

Neira, J.A., Revilla Escobar, K.Y., Aldas Morejon, J.P. and Sánchez Llaguno, S.N. 2020. Métodos de fermentación del cacao nacional (*Theobroma cacao*) y su influencia en las características físico-químicas, contenido de cadmio y perfiles sensoriales. *Alternativas*, *21*(3), 42-48. https://doi.org/10.23878/alternativas.v21i3.339

Perea, J., Cadena, T. and Herrera, J. 2019. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes. *Revista de La Universidad Industrial de Santander*, *41*(2), 128-134.

Portillo, E., Graziani De Farinas, L. and Betancourt, E. 2007. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de maracaibo. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia*, *24*(3), 522-546. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Quevedo, J.N., Romero Lopez, J.A. and Tuz Guncay, I.G. 2018. Calidad fisico quimico y sensorial de granos y licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando cinco metodos de fermentacion. *Revista Cientifica Agrosistemas*, *6*(May), 115, 127.

Quintana, M. and Aguilar, J. 2018. Denominación de origen de cacao ecuatoriano: ¿un aporte de marketing, global? *INNOVA Research Journal*, *3*(10), 68-76. https://doi.org/https://doi.org/10.33890/innova.v3.n10.1.2018.825

Rivera, R., Mecías, F., Guzmán, Á., Peña, M., Medina, H., Casanova, L., Barrera, A. and Nivela, P. 2012. Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo Nacional. *Ciencia y Tecnología*, *5*(1), 7-12. https://doi.org/https://doi.org/10.18779/cyt.v5i1.120

Sánchez, M., Vargas, Y., Burbano, R., Calero, A. and Ramírez, C. 2020. Evaluación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.), usando dos fermentadores, provincias Orellana y Sucumbíos, Ecuador. *Green World Journal Artículo*, *3*(1), 1-9.

Torres, J. and Pérez, R. 2023. Caracterización de los residuos de cacao generados con potencial valor, para su uso en la industria alimentaria, en el cantón Santo Domingo, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. ¿Fuente?

Umaña, N.J. 2015. Evaluación física y sensorial de pechuga de pollo (*Pectoralis major*) de dos marcas comercializadas en Honduras. https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4658/1/AGI-2015-039.pdf

Ureña, M., Andrade, J., Rivera, J. and Chire, G. 2022. Propiedades fisicas y quimicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Peru. ¿Revista?. 10(4). http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422019000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Vera, J., Benavides, J., Vásquez, L., Alvarado, K., Reyes, J., Intriago, F., Naga, M. and Castro, V. 2023. Effects of two fermentative methods on cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario, induced with *Rhizobium japonicum* to reduce cadmium. *Revista Colombiana de Investigación Agroindustriales*, *10*(1), 95-106. https://doi.org/https://doi.org/10.23850/24220582.5460

Vera, J., Erazo, C., Intriago, F. and Vásquez, L. 2022. Induction of *Rhizobium japonicum* in the fermentative mass of two varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium. *International Journal of Health Sciences*, *6*(3), 11354-11371. https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS3.8672

Vera, J., Intriago, F., Vásquez, L. and Alvarado, K. 2022. Inducción anaérobica de bradyrhizobium japonicum en la postcosecha de híbridos experimentales de cacao y su mejoramiento en la calidad fermentativa. *Journal of Science and Research*, *7*(2), 50-69. https://doi.org/https://zenodo.org/record/7723254.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Renal physiopathologic changes in diabetic Golden-Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed with hypercaloric diet

Cambios fisiopatológicos renales en hámster sirio-dorado (*Mesocricetus auratus*) diabéticos alimentados con dieta hipercalórica

Francisco Javier Gálvez-Gastélum[1], Bertha Adriana Alvarez-Rodríguez[1], Irinea Yañez-Sánchez[2], José Alfredo Domínguez-Rosales[3], Citlali Arlae Rojas-López[4], Jaime Palomares-Marín[1], Itzae Adonai Gutiérrez-Hurtado[5], Adriana María Salazar Montes[3] and José María Vera-Cruz[5]*

[1] Departamento de Microbiología y Patología, CUCS, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
[2] Centro de investigación en Nanociencias y Nanotecnología, Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, CUValles, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
[3] Instituto de enfermedades crónico-degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, CUCS, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
[4] Departamento de producción animal, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
[5] Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genomica, CUCS, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

ABSTRACT:

Background: Diabetic nephropathy is the single major cause of end stage renal failure. The increase of visceral adipose tissue may lead to glomerular hypertrophy and chronic kidney disease. Our objective was to determine renal changes in diabetic Golden-Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) supplemented with a hypercaloric diet. *Methods***:** One group of animals (n =10) was fed with a standard diet (SD), and the other group (n =10) was fed with a hypercaloric diet (HCD) for 1 month. Afterwards, both groups were treated with three doses of Streptozotocin. Hyperglycemia was determined throughout 73 d. The animal's weight, blood and kidney tissues were obtained for analysis. *Results***:** Diabetic animals fed with HCD diet manifested hyperglycemia (250 - 350 mg/dL) with significant weight loss (40 g), and an important glomerular filtration rate decrement (0.491 mL/min). Regarding renal fibrosis, all animals showed an increase of glomerular, interstitial, and cortical extracellular matrix (36.3, 75.2 and 70.7 %, respectively). Diabetic animals that were SD-fed showed only mild hyperglycemia and slight increase of glomerular, interstitial, and cortical extracellular matrix. A group of animals (n = 5), fed exclusively with HCD, was also included in the study. Conclusions: Our finding suggests that HCD feeding can accelerate the progression of chronic kidney disease in a diabetic condition.

Keywords: Diabetic, Nephropathy, Hypercaloric diet, Histopathologic, Fibrosis.

RESUMEN

Antecedentes: la nefropatía diabética es la principal causa de insuficiencia renal terminal. El aumento del tejido adiposo visceral puede provocar hipertrofia glomerular y enfermedad renal crónica. El objetivo es determinar los cambios renales en hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) diabéticos suplementados con una dieta hipercalórica. Métodos: Un grupo de animales (n =10) alimentado con dieta estándar (SD) y otro (n =10) con dieta hipercalórica (HCD) durante 1 mes. Posteriormente, ambos grupos fueron tratados con tres dosis de Estreptozotocina. La hiperglucemia se determinó durante 73 días. Se obtuvo el peso de los animales, sangre y tejido renal. Resultados: Los animales diabéticos alimentados con HCD manifestaron hiperglucemia (250-350 mg/dL) con pérdida de peso significativa (40 g), disminución del filtrado glomerular (0.491 mL/min) y aumento de la matriz extracelular glomerular, intersticial y cortical (36.3, 75.2 y 70.7 %, respectivamente). Los animales diabéticos que fueron alimentados con SD mostraron sólo una hiperglucemia leve y un ligero aumento de la matriz extracelular glomerular, intersticial y cortical. Un grupo de animales (n = 5) alimentados exclusivamente con HCD fue incluido en el estudio. Conclusiones: Nuestro hallazgo sugiere que la alimentación con HCD puede acelerar la progresión de la enfermedad renal crónica en una condición diabética.

Palabras clave: Diabético, Nefropatía, Dieta hipercalórica, Histopatológico, Fibrosis.

INTRODUCTION

End-stage renal disease (ESRD) has become the most common cause of diabetes, also known as diabetic nephropathy (DN), in Western countries. It remains an important clinical problem with substantial medical comorbidity (Kalantar-Zadeh *et al*., 2021). The high incidence and prevalence of ESRD has a rapid impact on global health, and represent a health care burden; it also disproportionately affects low- and middle-income countries (Thurlow *et al*., 2021). Demographics of ESRD diabetic patients indicate that the populations at highest risk are women, African American, Hispanic American, Asian American, Native American, and Pacific Islanders (Bleyer *et al*., 2008).

*Author for correspondence: José María Vera-Cruz
e-mail: chemavera@hotmail.com
Received: August 16, 2024
Accepted: October 25, 2024
Published: November 27, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2420

The symptoms of DN are characterized by proteinuria, kidney hypertrophy, increased urinary albumin excretion, decreased kidney function, glomerulosclerosis, and accumulation of extracellular matrix proteins in the tubular-interstitial zone, which eventually results in ESRD (Uil *et al*., 2018). In particular, urinary albumin is associated with histopathologic features such as progressive mesangial expansion. It is mainly due to the accumulation of type IV collagen, laminin, fibronectin, proteoglycans and other proteins, in the extracellular matrix (ECM). Albuminuria progress ensues in glomerulosclerosis, arteriolar hyalinosis, and tubulointerstitial fibrosis development. These pathologic features correlate to the glomerular filtration rate (GFR) in humans with diabetes and kidney disease (Dizin *et al*., 2013; Breyer *et al*., 2005).

There are several factors that lead to diabetes mellitus. For instance, pharmacology, diet, or more recently, SARS-CoV-2 (COVID-19) can trigger said disease. The use of antibiotics during childhood has been recently associated with pancreatic islet alterations, as well as modulating insulin secretion and the proliferation of β-cells. Likewise, antibiotic treatment in prenatal mice results in gut microbiome changes such as adiposity and hepatic metabolism of lipid and cholesterol (Cox *et al*., 2014; Li *et al*., 2009). Based on this information, the use of antibiotics can be related to diabetic conditions and kidney damage through increases in adiposity. Furthermore, a key factor in the development of diabetic renal injury is diet. Similar to humans, hamsters were hyper-responsive to increasing cholesterol levels (Zhang *et al*., 2009). Adding to this, carbohydrates in the diet can induce changes in both glucose and lipid metabolism. Hence, carbohydrate-rich diets may increase the risk of the development of chronic kidney disease (CKD) in non-diabetic subjects (Nam *et al*., 2019; Elsisy *et al*., 2021). High-fat-high-carbohydrate diet induces signs of early and mild podocyte stress in animals, a characteristic of renal damage during metabolic syndrome and obesity (Seikrit *et al*., 2021).

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Twenty-five male Golden-Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*), weighing approximately 140 g each, were used divided into 3 groups. All of the subjects were housed in a room with a 12/12-h light/dark cycle, and an ambient temperature between 22 °C and 25 °C under specific pathogen-free conditions. The experiment took place in the Bioterium located at the *Centro Universitario de Ciencias de la Salud* (CUCS), from the *Universidad de Guadalajara*. The first group of hamsters (10 animals) was fed a standard diet (SD), consisting (as a percentage of total kcal) of 12% fat, 60% carbohydrates, and 28% protein. The second group (10 animals) was fed a hypercaloric diet (HCD), which consisted of the SD enriched with 1% cholesterol, 10% coconut oil, and 15% sugar. All animals (SD and HCD groups) were fed for one month. All of the subjects were previously induced to diabetes by an intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich) in sodium-citrate buffer (0.2M, pH 4.5), once a day for 3 consecutive days at a dose of 50, 40 and 40 mg/kg, respectively (0.3 mg/g approximately). Hamsters had free access to food, water and continued on their original diets for the duration of the study. A group HCD fed (without STZ-treatment) was included as control. After four months, the animals were anesthetized with Ketamine (65 mg/kg) and Xylazine (7 mg/kg) in order to then be sacrificed for biological sample obtaining (Figure 1). All experiments were conducted according to the internationally accepted principles for the care and use of laboratory animals, and the guidelines of the Animal Research Reporting of in vivo Experiments (ARRIVE). It is worth mentioning that the researchers have experience handling laboratory animals and were trained through Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) courses and respecting the Official Standard of Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999).

Urine and blood examination

The blood glucose levels were monitored using the One-touch Ultra glucose monitoring system (Lifescan *Johnson & Johnson* Company), and hamsters were considered to be diabetic when three consecutives blood glucose determinations resulted in 200 mg/dL or above. To perform a glucose curve, glucose measurements were taken on days 3, 8, 16, 22, 29, 49, 58 and 73 after the last STZ-administration.

Urine samples were collected twenty-four hours before death from each animal (in order to determine 24-h urinary volumes) by placing the hamsters in a previously cleaned metabolic cage. In addition, approximately 10 mL of blood were obtained from cardiac puncture. Uric acid, total proteins, creatinine, albumin, urea and sodium (Na), potassium (K), and chlorine (Cl) electrolytes in blood and/or urine, were measured following standard methods in an instrument of analysis (Shyncron CX9). The GFR was determined following the equation: GFR = (uCr*uV)/(sCr) [13, 14].

Histopathologic analysis

Kidneys were quickly removed, set in 10 % phosphate-buffered formalin solution and then embedded in paraffin. Kidneys were cut into semithin sections of 4 - 5 υm. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and

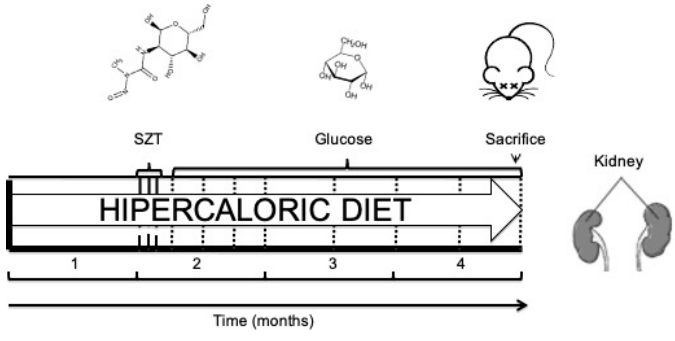


Figura. 1. Diseño experimental.
Figure 1. Experimental design.

Masson's trichrome satin (HYCEL SA of CV, México). A single pathologist, unaware of the experimental protocol, analyzed all of the kidney's slides using a light microscope.

The extent of renal injury was assessed by a histopathologic analysis of the glomerular sclerosis and interstitial alterations (tubular and renal atrophy replaced by fibrous connective tissue), in representative renal tissue of each experimental group. The glomerulosclerosis, renal tubule damage (tubular atrophy), and interstitial fibrosis are cataloged in five groups, between 0 and 4. Glomerulosclerosis, renal tubule damage (tubular atrophy), and interstitial fibrosis are categorized into five groups, from 0 to 4. A score of 0 indicates the absence of damage; a score of 1 represents less than 25 % of minor damage; a score of 2 corresponds to approximately 25 % to less than 50 % of damage, around the median. A score of 3 denotes about 50 % to 75 % of damage (approximately two-thirds of the area), and a score of 4 indicates damage present throughout the entire area (> 75 %) (Vázquez-Méndez *et al*., 2020).

Fibrosis determination

Masson's trichrome-stained renal slides from each animal were analyzed, in particular measuring the area, the diameter and the fibrosis of glomeruli. The damage of renal tissue was evaluated in a computational system of image analysis, using an Olympus BX51 microscope equipped with a DP71 camera, and Image-ProPlus 6.3 software from Media Cybernetics. From each group of animals ($n = 4$), 50 glomeruli were analyzed in 20 random fields (magnification 40X) of tissue sections.

Total collagen was tested by measuring the concentration of hydroxyproline as described by Rojkind *et al*. (1974). Briefly, renal tissue was hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 24 hours. Samples were incubated with a chloramine-T buffer for 10 m at room temperature. Ehrlich's reagent was added, and the samples were again incubated for 45 minutes at 65 °C. Absorbance of each sample was measured at 560 nm using a spectrophotometer (Thermo Scientific, Biomate 3, USA). Collagen accumulation was expressed as percent of collagen in each experimental group.

Statistical analysis

The data are expressed as mean ± SD. Analysis through the t-Student test was used to compare the differences between groups. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Hyperglycemia

Approximately 95 % of hamsters that receive HCD+STZ, manifested severe hyperglycemia (plasma glucose level of 250-350 mg/dL throughout all of the experiment) as shown in figure 2A. Approximately 30 % of the animals, which exhibited significant weight loss (40 g) and dehydration, as shown in Figure 2B, were humanely euthanized by cervical dislocation, performed by trained personnel in accordance with ethical guidelines to prevent further suffering. Death was confirmed

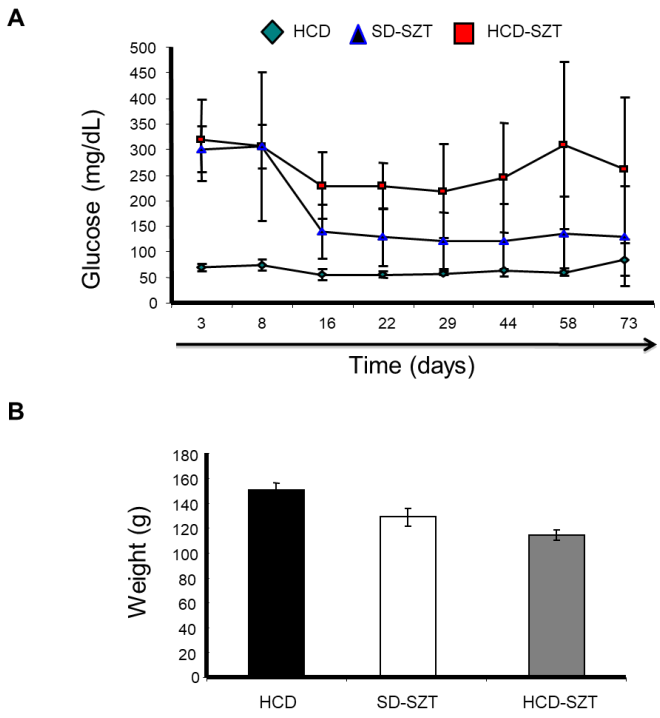


Figura 2. Determinaciones de glucosa y peso.
Figure 2. Glucose and weight determinations. A) shows a constant elevation of glucose concentration (mg/dL) observed in HCD-STZ group (line with red-box). B) an important decrement in weight (g) of animals HCD fed plus STZ treated. The results are presented as means ± SD, with $p<0.05$ indicating statistical significance.

by the absence of reflexes and cardiac activity. The hamsters that received SD+STZ showed only mild hyperglycemia (140-160 mg/dL). The undernourishment and dehydration were not as evident, but said animals still presented moderate weight loss (18 g) when compared to the former group. The remaining hamsters that were only HCD fed did not present hyperglycemia, undernourishment nor dehydration.

Biochemical analysis

The biochemical analysis demonstrated that the serum uric acid increased 28.7 % and 73 % respectively in both animal groups, the SD group, and the HCD that was treated with STZ. In urine, uric acid only decreased (61%) in diabetic animals induced by STZ that were fed with HCD. Urea in serum is normal in all 3 groups, but urine increased significantly (138 %) in diabetic animals induced with STZ plus HCD (in STZ plus SD, the group increase was 27 %). Serum creatinine (Cr) concentrations increased slightly at the end of experiment in both animal groups that were treated with STZ. Moreover, uric Cr significantly decreased (78%) in the experimental group treated with STZ plus HCD, while in the STZ + SD group, it decreased 31%. All of this data indicates a tendency consistent with chronic and progressive renal failure. Total proteins experienced no changes (urine or serum) in the 3 groups. Serum albumin decreased significantly (8%) in the animals which received STZ + HCD and increased (31%) in urine (Table 1). In the electrolytes analysis related to urine,

Tabla 1. Análisis bioquímico en cada grupo experimental.
Table 1. Biochemical analysis in each experimental group. Table 1A show concentration (mg/dL) of uric acid, total proteins, albumin, urea and creatinine (urine and serum) in each experimental group. Table B, show the Na, K and Cl electrolytes levels (mM/L) in serum and urine in each treatment. The results are presented as means ± standard deviation (SD). Differences are considered statistically significant when $p < 0.05$. Statistically significant results are marked with an asterisk (*).

Table A

	Uric Acid (mg/dL)		Total Proteins (g/dL)		Albumin (mg/dL)		Urea (mg/dL)		Creatinine (mg/dL)	
Group	Serum	Urine	Serum	Urine	Serum	Urine	Serum	Urine	Serum	Urine
HCD	1.5 ± 0.61*	10.8±2.42*	5.1 ± 0.59	0.1 ± 0.08	2.2 ± 0.28	156.5 ± 106.4	32.7 ± 3.2	261.2 ± 111	0.45 ± 0.06	143.33 ± 28.8
SD + STZ	1.9 ± 0.54	11.2±4.42*	5.33 ± 0.33	0.1 ± 0.14	2.3 ± 0.10*	152.2 ± 33.19	35 ± 1.2	333.7 ± 169	0.46 ± 0.13	103.26 ± 46.4
HCD + STZ	2.6 ± 0.71*	4.2 ± 4.8*	5.2 ± 0.57	0.1 ± 0.10	2.1 ± 0.07*	205.6 ± 60.6	35.5 ± 4.9	621 ± 313.6*	0.61 ± 0.36	32.87 ± 22.2*

Table B

Group	Na (mM/L)		K (mM/L)		Cl (mM/L)	
	Serum	Urine	Serum	Urine	Serum	Urine
HCD	132.5 ± 14.7	137.8 ± 50.6	6.4 ± 0.5*	241.6 ± 9.9*	91.8 ± 9.6	114.1 ± 83.9
SD + STZ	145.4 ± 0.94	107 ± 60.6	6.2 ± 0.4*	190.7 ± 56.7*	101.2 ± 1.2	58.24 ± 46.5
HCD + STZ	140.4 ± 7.2	107.5 ± 47.2	7.7 ± 0.6*	83.2 ± 39.7*	100.9 ± 2.8*	0 ± 0

sodium decreased in both STZ-treated groups, while in serum no significant changes were present. In serum, potassium showed an increase of 20 % exclusively in the animals that received STZ + SD. While in urine, the potassium decreased significantly to 66 % in this same group (the other group treated with STZ decreased as well, but in less proportion - 21 %). In serum, chlorine increased in both STZ-treated groups to 10 %. Nevertheless, in urine, these same groups significantly decreased the concentration to 50 % for STZ + SD and 100 % for STZ+HCD.

Renal function

GFR was calculated with respect to renal creatinine clearance, in 24-h urine collection (Figure 3A). A single measurement of serum creatinine was done, as indicated by the Cockcroft-Gault equation. As shown in Figure 3B, the GFR in HCD and in SD plus STZ groups was similar (0.671 and 0.672 mL/min, respectively), but in diabetic animals, HCD fed, the GFR decreased significatively, around 30 % (0.491 mL/min).

Histopathologic analysis

The glomerular tissue damage was determined to traverse histomorphometric changes of glomeruli, characterized by ECM accumulation in the intra- and extra-glomerular space. This alters the circular shape, whose evolution can progress to functional atrophies or Kimmelstiel-Wilson lesion (Islas Andrade and Revilla Monsalve, 2005), and in addition, presents extravasations even in the Bowman's space. The interstitial matrix was determined by the presence or absence of vacuolization–glycogen drops (Armanni-Ebstein changes), which have been related to hyper-glucose (Islas Andrade and Revilla Monsalve, 2005). The animals of the HCD group presented enlargement of the capillary wall, mesangial-intercellular expansion, decrement of the space in the Bowman's capsule, tubule interstitial vacuolization, loss of luminal area, initial changes in the presence of ECM proteins, and an increment of inter-tubular space, as shown in Table 2. Animals of the SD-STZ group showed similar characteristics, though more prominent, alongside glomerular atrophy. Notably, animals that received SD plus STZ demonstrated an exacerbation of significantly aggressive features and atrophy with extrusion into Bowman's space. Furthermore, significant evidence of glomerulosclerosis, tubular atrophy, and interstitial fibrosis was observed after feeding animals with HCD-STZ, as shown in Table 3. At the end of the experiments, the score of glomerulosclerosis, tubular atrophy, and interstitial fibrosis was 1 in

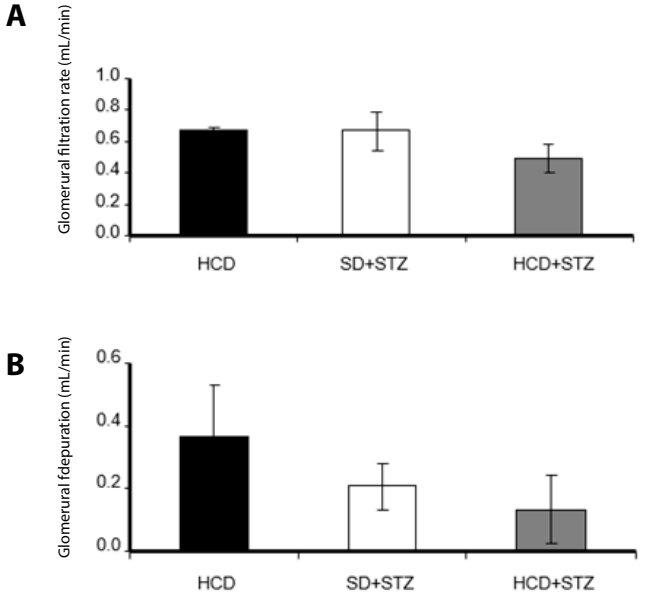
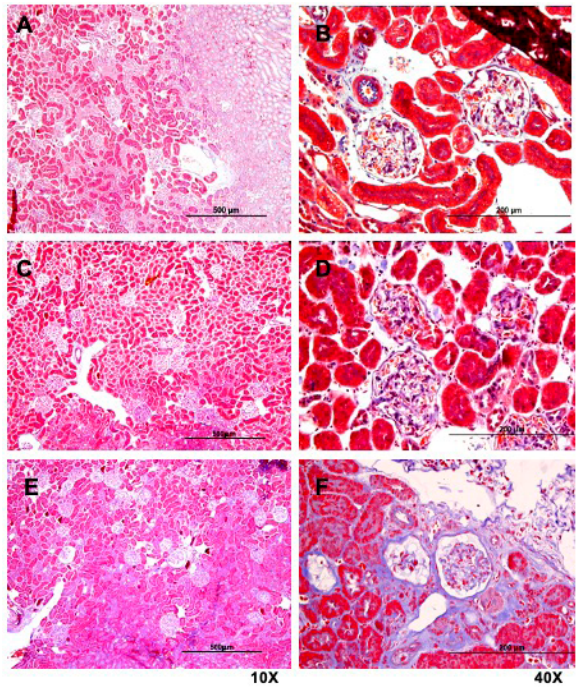


Figura 3. Análisis de función renal.
Figure 3. Renal function analysis. A) represent creatinine depuration in HCD, standard diet plus streptozotocin (SD-STZ) and hypercaloric diet plus streptozotocin (HCD-STZ) animals; B) indicate the glomerular filtration rate in each experimental group. The results are represented as mean ± SD, in mL/min.

CHARACTERISTICS	HCD	SD-STZ	HCD-STZ
Thickening of capillary wall	✔	✔	✔
Intercellular-mesangial expansion	✔	✔	✔
Decrease in space in Bowman's capsule	✔	✔	✔
Tubulo-interstitial vacuolization	✔	✔	✔
Loss of the luminal area	✔	✔	✔
Increment of ECM proteins	✔	✔	✔
Increase in inter-tubular spaces	✔	✔	✔
Glomerular atrophy		✔	✔
Atrophy with extrusion into Bowman's space			✔

Tabla 2. Análisis histopatológico.
Table 2. Histopathological evaluation. The renal characteristics in each experimental group are indicated by the √ presence and the damage intensity it represented by its size.



Characteristic	HCD	SD-STZ	HCD-STZ
Glomerular sclerosis	1	2	3
Tubular atrophy	1	1	1
Interstitial fibrosis	1	1	2
Total	3	4	6

Tabla 3. Indice de daño renal.
Table 3. Kidney damage rate. The group of HCD-STZ animals displayed an exacerbated damage assessed by increments of glomerular sclerosis, interstitial fibrosis, and tubular atrophy. A total of 4 cortical fields per animal were analyzed.

the HCD group; glomerulosclerosis (2), tubular atrophy, and interstitial fibrosis (1) in the SD group. This suggests that, by the end of the experiments, renal scarring was moderate to severe in both groups. Nevertheless, in the HCD-STZ group, glomerulosclerosis and interstitial fibrosis (3 and 2 scores, respectively) were exacerbated.

Fibrosis determinations

Renal fibrosis evaluated by a morphometric analysis and hydroxyproline biochemical determinations, demonstrated a significant increase only in the animals that receive HCD+STZ, as much in glomeruli, interstice, and crust (36.3, 75.2 and 70.7 %, respectively) (Figure 4 E, F). The SD+STZ group (Figure 4 C, D) presented a slight increase of glomerular, interstitial, and cortical extracellular matrix (1.7, 12.5 and 11.2 %, respectively) with respect to HCD group (Figure 4 A, B). The progression of collagen deposition in kidney tissue was also confirmed by the measurement of tissue hydroxyproline content, that progressively increased in the HCD+STZ group. Results obtained with histological analysis and hydroxyproline determinations showed structural changes in renal tissue during the development of kidney fibrosis.

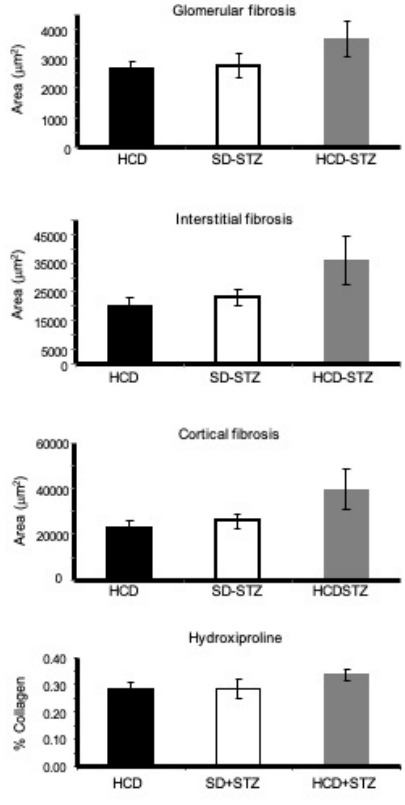


Figura. 4. Determinación de fibrosis.
Figure 4. Fibrosis determination. Representative images of renal tissue Masson trichrome stained in each experimental group, where A and B correspond to HCD, C and D for SD-STZ and E and F to HCD-STZ animal groups. The panels of graphics indicate fibrosis determination (μm^2) by computational morphometry in glomerular, interstitial, and cortical regions represented as mean ± SD in each group of animals, similarly, the percentage of collagen proteins (hydroxyproline) is shown.

DISCUSSION

End-stage renal disease is one of the most prevalent and irreversible complications of hypertension, diabetes, and inherent renal diseases; it affects a significant number of people worldwide (Al-Rajhi and Al Salmi, 2020). The incidence of ESRD is increasing substantially, which, as a result, means the impact of said condition and its treatment has widespread consequences for healthcare services, individuals, and society (Al-Rajhi and Al Salmi, 2020). ESRD causes significant biochemical abnormalities leading to symptom groups such as the uremic syndrome, which negatively impacts an individual's quality of life. In this renal disease, the progressive accumulation of ECM in the glomeruli (glomerulosclerosis) and between tubules (tubule-interstitial fibrosis) are the final manifestations of chronic kidney disease (Cho, 2010).

Streptozotocin (STZ), an antibiotic derived from *Streptomyces achromogenes*, has significant antimicrobial action for a wide spectrum of organisms. Furthermore, toxicology studies in dogs and rhesus monkeys demonstrated that STZ had a potent diabetogenic effect (Mariee *et al*., 2009). On the other hand, rodents have been a preferred model for the study of diabetic pathophysiology because of their similarities to humans. In this regard, hamsters exhibit symptoms of diabetes that are similar to those in humans (Sweta *et al*., 2018).

In this experimental design, it was demonstrated that the administration of HCD+STZ in Golden Sirius Hamster (*Mesocricetus auratus*) increases the blood-glucose concentration when compared to animals fed with a normal diet plus STZ administration. However, Islam *et al*. (2009) stated that long-term high fat, either alone or in combination with STZ, induces constant hyperglycemia. Tesch and Allen (2007) proposed that the severity of injury is dependent on the genetic background of the species. The HCD+STZ group also had polyuria and loss of weight, probably due to the hydroelectric imbalance of organisms.

The excess of fluid dissolved substances can lead to an increase in the amount of urine produced by the kidneys. It also depends on the filtering capacity of the kidney; when there are renal tubules, it may be unable to reabsorb the filtered blood, which determines an increase in the amount of urine produced. Other studies reported factors that have been associated with renal disease, such as serum uric acid (Hovind *et al*., 2009). In this particular article, an increment in serum uric acid and diminution in urine is reported. Nevertheless, the role of uric acid in the development of diabetic nephropathy is not yet completely understood. More studies in rats indicated that the main injuries from uric acid increase are glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and arteriolar disease. The mechanism of the lesion appears to be related to the development of preglomerular arteriolar disease, which impairs the renal autoregulatory response and thereby causes glomerular hypertension (Feig *et al*., 2008). More recently, epidemiologic studies suggest that elevated uric acid levels are an independent predictor of the development of microalbuminuria (Feig *et al*., 2008; Lee *et al*., 2006). Also, increased blood urea nitrogen and creatinine in diabetic rats indicate progressive renal damage, which is taken as an index of altered GFR in diabetic nephropathy (Breyer *et al*., 2005; Kuhad *et al*., 2009). In the findings section of this article, the non-treated animals did not show an increase in the serum levels of urea nitrogen, in comparison with the STZ-plus treated animal where the urea significantly elevated.

Proteinuria is an indicator of glomerular damage and may be used as a measure for diabetic glomerulopathy. In diabetic nephropathy, it is strongly associated with pathological changes of diffusion and, less commonly, with the nodular form of diabetic glomerulosclerosis. The results presented in this article did not show changes in the levels of total proteins, and proteinuria is also viewed as a hemodynamic promoter of the progression of the disease in diabetic nephropathy (Williams, 2005). Urine albumin secretion is considered to be one of the most sensitive markers of renal injury. Results indicate a significant increase in albuminuria and a decrease in serum albumin in HCD+STZ. Reports by Lassila *et al*. (2004) also show that STZ-treated mice (C57BL/6) hyperlipidemic ApoE deficient, present an increase in the secretion of urine albumin (Lassila *et al*., 2004).

Oh *et al*. (2007) suggest that these hemodynamic changes are related to altered sodium balance, which might be associated with hemodynamic changes, responsible for the progression of diabetic nephropathy. This research found decreased urinary sodium in both groups with treatment plus diet, and not diet. Mapanga *et al*. (2009) reported that rats with STZ-induced diabetic nephropathy exhibited weekly decreases in urinary sodium excretion. As such, it is suggested that the increase of GFR possibly expanded the filtered load of sodium in the tubular filtrate, hence facilitating urinary sodium excretion. Furthermore, the elevated GFR observed in diabetic patients is the result of an increase in glomerular capillary surface area, plus an additional mechanism altering one or more of the other determinants of GFR. Currently, said other mechanism is considered to be a reduced tubuloglomerular feedback signal (Mapanga *et al*., 2009).

The diabetic kidney displays a primary increase in proximal tubular fluid and an electrolyte reabsorption, thereby presenting a reduced concentration of Na^+, K^+ and Cl^- to the macula densa cells of the juxtaglomerular apparatus. The resultant decreased uptake of these ions by these cells elicits an increase in the GFR of that nephron via a reduction in vascular tone, predominantly of the afferent arteriole (Singer, 2007). Similarly, the K^+ and Cl^- concentrations decreased in STZ-treated groups, but they were lower in the animals that received STZ plus the special diet. In serum, a significant increment of Cl^- was observed in both STZ-treated groups, and K^+ only increased in the STZ-treated plus high-fat diet fed group.

Renal function was assessed by measuring plasma and urine levels of creatinine. It has also been observed that increased serum creatinine in diabetic rats indicates progressive renal damage (Breyer *et al*., 2005), which is taken as an index of altered GFR in diabetic nephropathy. In this experiment, we reported a significant decrease of urinary

creatinine but a moderate elevation of serum creatinine in the HCD-STZ animals. The same animal group showed a significant decrement of creatinine depuration and alteration in the glomerular filtration rate. Popov *et al*. (2003) reported that hamsters with HCD presented augmented creatinine concentrations related to disturbances of the renal function. Said concentrations progress to nodular glomerulosclerosis and nephropathy after 20 weeks of diet (Popov *et al*., 2003). Yu *et al*. (2022) indicated that a high-fat diet in mice impairs renal function and increases proteinuria and proinflammatory cytokines by Wnt/β-catenin signaling induction. Similarly, Laurentius *et al*. (2019) stated that obesity induced by a high-fat diet in aging Long-Evans rats causes damage in renal structures due to an inflammatory microenvironment. Seikrit *et al*. (2021) reported that a hypercaloric diet induces podocyte damage and microinflammation in aged, non-diabetic rats for five months. Sugyeong *et al*. similarly observed that a high-fat diet increased protease-activating receptor 2 (PAR2) levels in the renal tubule epithelial region with increased inflammatory responses, oxidative stress, and fibrosis (Ha *et al*., 2022). However, Elsisy *et al*. (2021) suggested that a high-fructose diet induces more severe kidney damage in rats during 4 weeks than a high-fat diet within the same timeframe.

The results of this article showed that the histopathological features of capillary wall thickening, intercellular-mesangial expansion, decreased Bowman's space, increased ECM proteins, and glomerular atrophy with extrusion into Bowman's space are more aggressive in the HCD+STZ group. Similar characteristics were reported by Popov *et al*. (2023) in Golden Syrian hamsters with a high-fat diet for 20 weeks. Some of the main attributes are that the glomerular basal membrane (GBM) was modified, and the thickness of the GBM gradually increased. In addition, after 4 weeks of a high-fat diet, the thickened GBM developed focal enlargements and nodules that apparently compress and diminish the vascular capillary lumen. After 20 weeks, the hamsters with the high-fat diet showed that the mesangial area had increased (Popov *et al*., 2003).

The pathogenesis of chronic renal disease is characterized by a progressive decline of renal function and continuous accumulation of ECM. This in turn leads to diffuse fibrosis, probably by undergoing endothelial-myofibroblast transition in endothelial cells (Li *et al*., 2009; Efstratiadis *et al*., 2009). Renal scarring was assessed and blinded for this study. It is reported that HCD+STZ fed animals were cataloged in > 50 % of glomerular sclerosis, and between 20 % - 50 % of interstitial fibrosis.

Finally, it is demonstrated that all animals with HCD+STZ show an increment of glomerular, interstitial, and cortical ECM (Figure 5), when compared to the control group of only HCD. To corroborate the increment of renal fibrosis, a slight increase of collagen (hydroxyproline) was found only in the HCD+STZ group. In the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis, many cytokines and chemokines participated, particularly in the activation of the myofibroblast. One of said factors is the transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and platelet-derived growth factor (PDGF) (Lane *et al*., 2002). The second part of our investigation seeks to analyze the physiopathology of the experimental model of diabetic nephropathy at the molecular level.

CONCLUSIONS

This study conclusively demonstrates that the administration of STZ in Golden Syrian hamsters, combined with HCD, induces a significantly more severe metabolic and renal profile compared to a SD. The HCD+STZ group not only exhibited severe hyperglycemia but also experienced higher mortality, pronounced elevation of uric acid, and renal deterioration evidenced by reduced glomerular filtration rate and marked histological changes such as glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. These findings suggest that the combination of an HCD in diabetes exacerbates metabolic and renal complications, highlighting the critical importance of dietary factors in the progression of renal disease in diabetic models. This research provides significant evidence on the impact of diet in the development and worsening of diabetes-associated pathologies, which could have important implications for the clinical management of the disease in humans.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest in this work.

REFERENCES

Al-Rajhi, W. and Al Salmi, I. 2020. Quality of life and end stage kidney disease: Conceptual and theoretical issues. Journal of Nephrology and Renal Therapy. 6(3): 100037.

Bleyer, A.J., et al. 2008. Risk factors for development and progression of diabetic kidney disease and treatment patterns among diabetic siblings of patients with diabetic kidney disease. American Journal of Kidney Diseases. 51(1): 29-37.

Breyer, M.D., et al. 2005. Mouse models of diabetic nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology. 16(1): 27-45.

Cho, M.H. 2010. Renal fibrosis. Korean Journal of Pediatrics. 53(7): 735-740.

Cox, L.M., et al. 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. Cell. 158(4): 705-721.

Dizin, E., et al. 2013. Albuminuria induces a proinflammatory and profibrotic response in cortical collecting ducts via the 24p3 receptor. American Journal of Physiology - Renal Physiology. 305(7): F1053-F1063.

Efstratiadis, G., et al. 2009. Renal fibrosis. Hippokratia. 13(4): 224-229.

Elsisy, R.A., El-Magd, M.A. and Abdelkarim, M.A. 2021. High-fructose diet induces earlier and more severe kidney damage than high-fat diet on rats. Egyptian Journal of Histology. 44(2): 535-544.

Feig, D.I., Kang, D.H. and Johnson, R.J. 2008. Uric acid and cardiovascular risk. New England Journal of Medicine. 359(17): 1811-1821.

Ha, S., et al. 2022. Activation of PAR2 promotes high-fat diet-induced renal injury by inducing oxidative stress and

inflammation. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease. 1868(10): 166474.

Hovind, P., et al. 2009. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. Diabetes. 58(7): 1668-1671.

Islam, M.S. and Loots du, T. 2009. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology. 31(4): 249-261.

Islas Andrade, S.A. and Revilla Monsalve, M.C. 2005. Nefropatía diabética. In Hill, M.G. (ed.) *Diabetes Mellitus*. Vázquez Vega B, Meza Molina LM e Islas Andrade SA, pp. 330-347.

Kalantar-Zadeh, K., et al. 2021. Chronic kidney disease. Lancet. 398(10302): 786-802.

Krinke, G. 2000. The laboratory rat. handbook of experimental animals. San Diego, Calif.: Academic.

Kuhad, A., Sachdeva, A.K. and Chopra, K. 2009. Attenuation of renoinflammatory cascade in experimental model of diabetic nephropathy by sesamol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(14): 6123-6128.

Lane, A., et al. 2002. Interacting roles of myofibroblasts, apoptosis and fibrogenic growth factors in the pathogenesis of renal tubulo-interstitial fibrosis. Growth Factors. 20(3): 109-119.

Lassila, M., et al. 2004.Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. Journal of the American Society of Nephrology, 15(8): 2125-2138.

Laurentius, T., et al. 2019. High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. Journal of Inflammation. 16(1): 14.

Lee, T.N., et al. 2006. The diabetogenic antibiotic streptozotocin modifies the tryptic digest pattern for peptides of the enzyme O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-d-glucosaminidase that contain amino acid residues essential for enzymatic activity. Biochemical Pharmacology, 72(6): 710-718.

Li, J., Qu, X. and Bertram, J.F. 2009. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. American Journal of Pathology. 175(4): 1380-1388.

Mapanga, R.F., et al. 2009. Renal effects of plant-derived oleanolic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. Renal Failure. 31(6): 481-491.

Mariee, A.D., Abd-Allah, G.M. and El-Yamany, M.F. 2009. Renal oxidative stress and nitric oxide production in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: the possible modulatory effects of garlic (*Allium sativum* L.). Biotechnology and Applied Biochemistry. 52(3): 227-232.

Nam, K.H., et al. 2019. Carbohydrate-rich diet is associated with increased risk of incident chronic kidney disease in non-diabetic subjects. Journal of Clinical Medicine, 8(6): 793.

Oh, Y.K., et al. 2007. Altered renal sodium transporter expression in an animal model of type 2 diabetes mellitus. Journal of Korean Medical Science. 22(6): 1034-1041.

Popov, D., Simionescu, M. and Shepherd, P.R. 2003. Saturated-fat diet induces moderate diabetes and severe glomerulosclerosis in hamsters. Diabetologia. 46(10): 1408-1418.

Rojkind, M. and González, E. 1974. An improved method for determining specific radioactivities of proline-^{14}C and hydroxyproline-^{14}C in collagen and in noncollagenous proteins. Analytical Biochemistry. 57(1): 1-7.

Seikrit, C., et al. 2021. A hypercaloric diet induces early podocyte damage in aged, non-diabetic rats. Cellular Physiology and Biochemistry. 55(S4): 96-112.

Singer, M.A. 2007. Diabetes Mellitus. Comparative physiology, natural animal models and clinical medicine. Singapore.

Sweta, A., Chandana, H., and Sameer, G. 2018. Hamster as a model for diabetic study. International Journal of Research in Medical Sciences and Technology (IJRMST). 6: 245-250.

Tesch, G.H. and Allen, T.J. 2007. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton). 12(3): 261-266.

Thurlow, J.S., et al. 2021. Global epidemiology of end-stage kidney disease and disparities in kidney replacement therapy. American Journal of Nephrology. 52(2): 98-107.

Uil, M., et al. 2018. Combining streptozotocin and unilateral nephrectomy is an effective method for inducing experimental diabetic nephropathy in the 'resistant' C57Bl/6J mouse strain. Scientific Reports. 8(1): 5542.

Vázquez-Méndez, E., et al. 2020. Recombinant erythropoietin provides protection against renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease. Mediators of Inflammation. 27: 8937657.

Williams, M.E. 2005. Diabetic nephropathy: the proteinuria hypothesis. American Journal of Nephrology. 25(2): 77-94.

Yu, Y., et al. 2022. High fat diet induces kidney injury via stimulating Wnt/β-Catenin signaling. Frontiers in Medicine (Lausanne). 9: 851618.

Zhang, Z., et al. 2009. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. Molecular Nutrition & Food Research. 53(7): 921-30.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

The potential application of agroforestry residues in the adsorption of aniline

Aplicación potencial de residuos agroforestales en la adsorción de anilina

Perla A. Gonzalez Tineo[1], Yedidia Villegas Peralta[1]*, Beatriz Guadalupe González-González*, Edna Rosalba Meza Escalante, Denisse Serrano Palacios

[1] Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur col. Centro, CP. 85000 Cd. Obregón, Sonora, México.

[2] Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur col. Centro, CP. 85000 Cd. Obregón, Sonora, México.

ABSTRACT

A low-cost activated carbon based on agroforestry residues (AAC) was synthesized and characterized to remove aniline (AN), a health and environmentally toxic substance. The batch adsorption assays were used to assess the effect of contact time (1, 2, 6, 12, and 24 h), pH (2, 4, 6, and 8), and AN concentration (1, 5, and 10 mg/L). The adsorption mechanism of AN on ACC and commercial carbons (GAP and PAC) was evaluated and compared through Langmuir, Freundlich, and Temkin isotherms. The results show that AN removal increases with decreasing pH, reaching a maximum AAC removal capacity of 90 %. AAC resulted in similar efficiency to GAC > 90 % at 1 and 5 mg/L. Langmuir shows the best-fit model reaching an R^2 of 0.98. These models explain that the adsorption mechanism of AN on ACC is homogeneous, and monolayer adsorption occurs, achieving a maximum capacity of 1.20 and 1.16 mg/g for ACC and PAC, respectively, with a possible endothermic mechanism suggested by Temkin. The results showed that AAC could be considered an effective and economical adsorbent in removing the AN.

Keywords: Aromatic amine, residues, adsorption mechanism, activated carbon, isotherms.

RESUMEN

Se sintetizó y caracterizó carbón activado (CAA) de bajo costo a base de residuos agroforestales para la eliminación de anilina (AN), la cual es una sustancia tóxica para la salud y el medio ambiente. Se evaluó el efecto del tiempo de contacto (1, 2, 6, 12 y 24 h), pH (2 ,4 ,6 y 8) con 1, 5 y 10 mg/L de AN. El mecanismo de adsorción de AN en CAA y los carbones comerciales (CAG y CAP) fue evaluado y comparado con las isotermas de Langmuir, Freundlich y Temkin. Los resultados mostraron que la eliminación de AN aumentó con la disminución del pH, el CAA alcanzó una remoción máxima de 90 %. El CAA resultó en una eficiencia similar al CAG > 90 % a 1 y 5 mg/L. El modelo de Langmuir mostró el mejor ajuste con una R^2 de 0.98. Estos modelos explican que el mecanismo de adsorción de AN sobre CAA es homogéneo, y se produce adsorción en monocapa, alcanzando una capacidad máxima de 1.20 y 1.16 mg/g para CAG y CAP respectivamente, con un posible mecanismo endotérmico sugerido por Temkin. El CAA podría considerarse un adsorbente eficaz y económico en la eliminación del AN.

Palabras clave: Aminas aromáticas, residuos, mecanismos de adsorción, carbón activado, isotermas.

INTRODUCTION

Aniline (AN) is used widely in industries that manufacture pharmaceuticals, dyestuffs, rubbers, pesticides, plastics, and paints. Due to its extensive industrial use, it is possible to find AN in water bodies and environments such as lakes and rivers, which can even flow into the ocean (Khaniabadi *et al*., 2016). The estimated annual discharge of AN into water bodies is 30,000 tons by non-regulated discharge (Benito *et al*., 2017). Therefore, it has become one of the 129 prime concern pollutants, according to the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (Basiri *et al*., 2015). Thus, it is highly necessary to eliminate it from industrial effluents previously to their discharge into the water body (Khoshnamvand and Mostafapour, 2017). Several processes can be used to remove AN from wastewater or water sources, such as biodegradation (Liu *et al*., 2015), oxidation (Yan *et al*., 2021), coagulation (Chaturvedi and Katoch, 2020), flocculation (Ahmadi *et al*., 2017), and adsorption, among others.

The adsorption is the most used due to its high effectiveness on the laboratory or industrial scale (Ahmadi and Kord Mostafapour, 2017b). Adsorption technology has arisen as an eco-friendly solution to removing water pollutants (Srivastava *et al*., 2021; Deng *et al*., 2020); these have gained relevance for their high efficiency, environmental friendliness, ease of application, exceptional efficiency, and low cost (Fakhri, 2017; Lu *et al*., 2017). The most widely used adsorbents include carbon materials, zeolites, and recently, metal-organic frameworks (Huang *et al*., 2021). Although metal frameworks show excellent adsorption capacities, their synthesis implies high costs (Resasco *et al*., 2021). Therefore, carbon materials such as activated carbon (ACs) appear as a promising alternative for the removal of pollutants in wastewater due to their well-established properties, low cost, efficiency, and versatility in adsorption processes (Guo *et al*., 2024; Ghanbarpour Mamaghani *et al*., 2023).

*Author for correspondence: Yedidia Villegas Peralta
e-mail: yedidia.villegas@itson.edu.mx
Received: August 12, 2024
Accepted: September 12, 2024
Published: October 17, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2416

One of the challenges facing the adsorption process is the search for new materials that successfully remove organic contaminants (Zhou *et al*., 2019). One example is the use of unconventional adsorbents such as natural clay (Iglesias *et al*., 2013; Padilla-Ortega *et al*., 2013), or some industrial, agricultural, and forest materials (Bosch *et al*., 2022; Sharma *et al*., 2022; Zhu *et al*., 2021). The agroforestry wastes are known for their wide availability for activated carbon production with some properties such as porosity, capacity of adsorption, and appropriate surface activity (Rosales *et al*., 2015). Moreover, knowing the removal efficiency offered by various adsorbents is essential. However, it is of utmost importance to describe the affinity between the adsorbate and the adsorbent under determinate conditions at equilibrium (Abin-Bazaine, 2022). All this is possible using mathematical models that predict adsorption behavior; some of the most used equation models are Langmuir (Brazesh, 2021) and Freundlich, which are capable to help determine homogeneous or heterogeneous adsorption processes.

For all the aforementioned, this paper had two principal aims, i) Synthesize and characterize a cheap adsorbent prepared from agroforestry residues, and ii) Evaluate the adsorption mechanism of AN on activated carbon through Langmuir, Freundlich, and Temkin isotherms.

MATERIAL AND METHODS

Adsorbent preparation and characterization

Dried agroforestry residues (mesquite wastes) were mixed with H_3PO_4 solution at 40 % of concentration. The moisture of the residue mixture with the chemical agent was removed in an oven (EHOSELFC-3000 serials) at 105 °C for 12 h. In a muffle (NEY-M325) the dried material was thermally degraded at 400 °C for 2 h and cooled down under ambient conditions in a desiccator (NALGENE, 5312-0230). Subsequently, the obtained agroforestry-activated carbon (AAC) underwent several washes with deionized water to remove the remaining acid. Finally, the ACC was dried at 110 °C all day; the final product was used for characterization and adsorption essays. Physical parameters such as the moisture and ash content of ACC were characterized according to Yokout *et al*. (2015). The analysis for identifying the presence of the different chemical groups for ACC was determined using the Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), and the accessory used to read the samples was iD1 for diffuse reflectance. The Brunauer-Emmett-Teller (BET) method was followed to determine the superficial area through an advanced analyzer (Quantachrome Autosorb-iQ-C, USA). Commercial Granular Activated Carbon (GAC) and Powdered Activated Carbon (PAC) were also purchased commercially to compare a low-cost adsorbent with an existing one.

Characteristics of aniline

Aniline was obtained from the effluent of an anaerobic reactor that operated with wastewater from synthetic dyes and which concentration can reach 40 mg/L of AN. Table 1 shows the general characteristics of aniline.

Table 1. Properties of aniline.
Tabla 1. Propiedades de la anilina.

Parameter	Molecular Weight	λ max	Molecular Formula	Chemical Structure
Aniline	93.13	198	$C_6H_5NH_2$	 Aniline

Where: Molecular weight (mg/ mol); λ_{max} (nm)

Adsorption Batch Studies

The adsorption studies were carried out under different AN concentrations (1, 5, and 10 mg/L), contact times (1, 2, 6, 12, and 24 h), and pH (2, 4, 6, and 8). The pH solution was modified according to the necessity by dropping 0.1 N HCL. Each flask in the experiment had a working volume of 100 mL of AN sample that was contacted with 0.5 g of AAC with a stirring (50 rpm). A UV-visible spectrophotometer quantified AN at 198 nm. Equation 1 was used to estimate the removal efficiency.

$$\text{AN } R_{em}\,(\%) = \frac{Co - C1}{Co} x100 \quad (1)$$

Where: AN Rem (%) is the removal efficiency, C_o (mg/L) is the initial AN concentration, and C_1 (mg/L) is the final concentration of AN.

Adsorption Isotherms

Several models were suggested for analyzing equilibrium experiments. One of the most important is adsorption isotherms: Langmuir, Freundlich, and Temkin isotherms.

Freundlich isotherm is explaining as an adsorption heterogeneous, considering that exist various sites of adsorption with different quantities of heat energy (Asencios *et al*., 2022). The linearized equation is:

$$\text{Log qe} = \text{Log } K_F + \frac{1}{nF}\text{Log Ce} \quad (2)$$

Where q_e (mg/g) is the amount of adsorbate that is adsorbed in the adsorbent. C_e is the concentration (mg/L) of adsorbate in the equilibrium time. K_F is the constant related to the adsorption capacity (mg/g), and $1/n_F$ is a constant associated with adsorption intensity.

The Langmuir isotherm is a valid theoretical model for adsorption in a monolayer on a completely homogeneous surface. It has a finite number of identical and specific adsorption sites and negligible interaction between the molecules (Figueroa *et al*., 2015).

The linearized equation is:

$$\frac{Ce}{qe} = \frac{1}{q_{max}} C_e + \frac{1}{K_L\, q_{max}} \quad (3)$$

Where q_{max} is the maximum monolayer adsorption capacity (mg/g), K_L is the Langmuir constant (L/mg), C_e equilibrium concentration (mg/L), and q_e is the adsorption capacity at equilibrium (mg/g).

The constant separation factor or equilibrium parameter, R_L, is a Langmuir isotherm parameter defined by equation 4 (Hall *et al*., 1996; Webber *et al*., 1974). The value of R_L suggests that adsorption can be unfavorable ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorable ($0 < R_L < 1$), or irreversible ($R_L = 0$).

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_o} \quad (4)$$

Where C_o (mg/L) is the initial dye concentration and K_L (L/mg) is the Langmuir constant.

Temkin isotherm assumes the heat of adsorption of all the molecules in the layer would decrease proportionally with the increase in the coverage of the adsorbent (Hammed and Rahman, 2008). The linear form of Temkin isotherm is:

$$qe = \frac{RT}{b_T} \ln K_T + \frac{RT}{b_T} \ln C_e \quad (5)$$

Where R (8.314 J/mol·K) is the ideal gas constant, T is the temperature (K), b_T is the Temkin constant associated with the heat of adsorption (J/mol), K_T is the equilibrium binding constant (L/g).

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation, and the isotherm equations were developed using Minitab Statistical 16 and Microsoft Excel software version 16. A regression adjustment was applied to find the best correlation coefficient close to 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of adsorbent

The moisture and ash content parameters are important in adsorption efficiency (Tay *et al*., 2009). According to Castellar *et al*. (2019), the high ash percentage (≤ 30 %) would indicate an insufficient activation process. The AAC is in the range of other ACs (6.5 %). The moisture content of ACs varies widely ranging from 2 % to 90 %, and it is considered that values greater than 15 % decrease the adsorption capability. Finally, the yield parameter is fundamental in terms of costs since it implies the weight of activated carbon per weight of residues utilized for activation. The AAC showed a yield of 50 %, which is higher than others, such as those made from coffee (30 %) or bay leaf (29 %), but lower than that made from coconut (80 %) (Yunus *et al*., 2022).

Functional groups (FTIR) and specific surface area (BET)

In Figure 1, the main AAC functional groups are shown. The functional group regions show a broad peak around 3800-3600 cm^{-1} due to -OH stretching vibrations (Shurvell *et al*., 2006). The signal at 2361.82 cm^{-1} is attributed to the C–H stretching vibration (Varghese *et al*., 2024). The signals in a range of 1300 to 1200 cm^{-1} were accredited to C=C aromatic stretching; according to the research of Tetteh *et al*. (2024), these bands also can appear in the range of 1600 to 1500 cm^{-1}. The C-C groups were identified at 1068.68 cm^{-1}. On the other hand, the bands at 700-900 cm^{-1} indicated C-H bond vibrations and deformations in aromatic rings (Ghosh, 2020). Additionally, the characterization of the specific superficial area for the AAC resulted in 427.881 m^2/g, which was favorable for the adsorption. Commercial activated carbons (PAC and GAC) had a surface area of 800 and 400 m^2/g, respectively, according to Carbotecnia ®. The difference in the surface area values is attributed to the raw material and the use of chemical or physical activation methods (Munoz *et al*., 2003).

Morphology SEM analysis

The Agroforestry Activated Carbon (AAC) shows a defined surface morphology represented by ordered fibers, which is presented in the image of SEM 1000 X (Figure 2). The arrangement of the fibers suggests an advantage for adsorption favored by the channels formed between fibers (Brasquet *et al*., 2020). According to Li *et al*. (2021), the benefits of this kind of arrangement include a large specific surface area, high adsorption rate and capacity, unique surface reactivity,

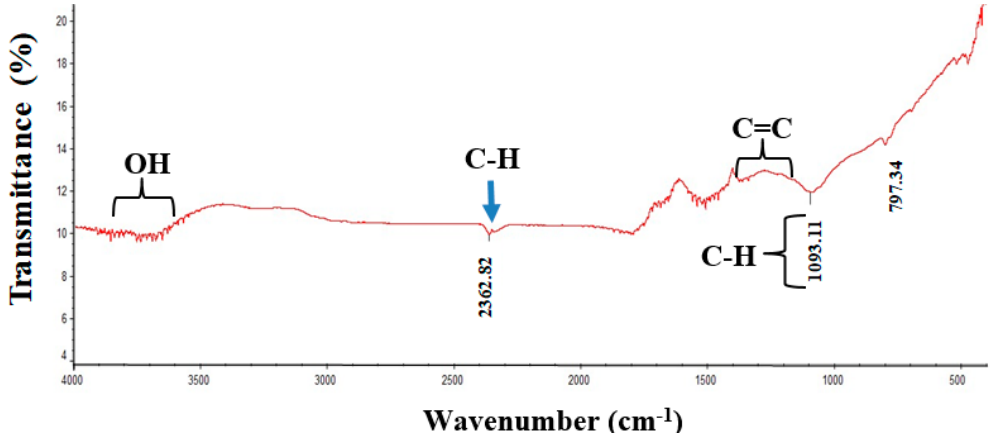


Figure 1. FTIR infrared spectrum of Agroforestry Activated Carbon (AAC).
Figura 1. Espectro infrarrojo FTIR de carbon activado agroforestal (CAA).

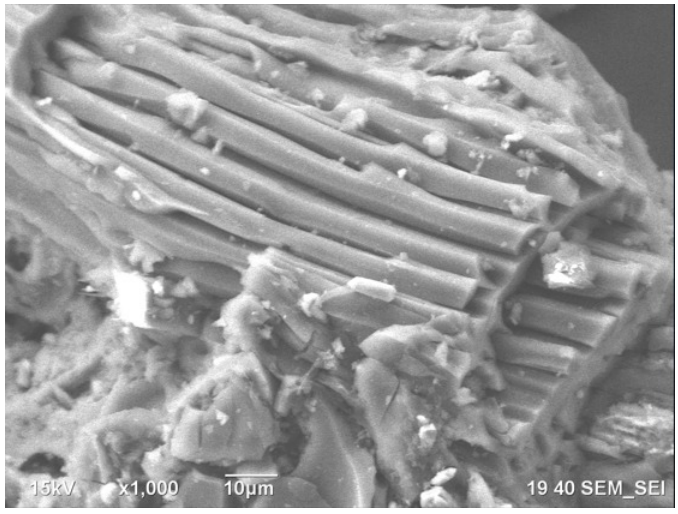


Figure 2. SEM image at 1000 X of Agroforestry Activated Carbon (AAC).
Figura 2. Imagen de SEM a 1000 X de carbón activado agroforestal (CAA).

and ease of synthesis. Additionally, Burchell *et al*. (2017), in their study, establish that the large micropore volume of fiber arrangement compared to GAC is the greatest advantage. This can be directly attributed to the fiber structure, which has a very low fraction of closed pores and a large fraction of open pores.

Effect of pH on the efficiency removal

The pH is a fundamental parameter in the adsorption process (Kord Mostafapour *et al*., 2016). In Figure 3, this study obtained the maximum removal of AN at acidic pH (2 and 4). In contrast, preliminary analyses indicated that at pH ≥8 (results not shown), AN adsorption was not favored. In acidic conditions, the adsorption process increased its efficiency from 52 to ≥ 80 %), and this behavior was similar at each concentration studied, which was 1, 5, and 10 mg/L.

AN is a weak base of an anionic nature that can be transformed into an anilinium ion if it is positively charged under acidic conditions. In this regard, the PKa value of aniline is 4.6, so at acidic pH values, it is positively charged, which increases the H^+concentration. Moreover, at alkaline pH, aniline adsorption reduces the competition of other anions, such as OH- (Kord Mostafapour *et al*., 2016). Sun *et al*. (2021) observed a similar behavior, performing adsorption tests with AC in a pH range between 2 to 12, noting that the adsorption capacity increased in the range of 2 to 5 units, while from pH 5, the capacity decreased by up to 10 %. On the other hand, Guo *et al*. (2009) conducted an AN adsorption test with starch-derived compounds; they observed that the adsorption capacities reached the highest value at about pH 4.

Aniline removal efficiency

The experiment was performed with three different activated carbons: 1) AAC prepared during this study, 2) commercial granular activated carbon (GAC), and 3) powdered activated carbon (PAC). GAC and PAC were purchased to compare a low-cost adsorbent with an existing one on the market.

Table 2 shows that the GAC has removal efficiencies similar to commercial GAC, up to 5 mg/L of AN. On the other hand, one parameter that influenced the adsorption of AN was particle size. PAC used in the tests as a comparison was more efficient than GAC and AAC. At pH 2 and 4 (conditions at which the highest removal was achieved), these carbons showed a removal rate of about 89-90 %. Meanwhile, PAC achieved almost 94 % removal of AN. The above implies approximately 5 % higher. The same situation was repeated at a maximum concentration of 10 mg/L. Wu *et al*. (2013) carried out a study about the effect of particle size on AN adsorption with PAC in five size ranges from 6 to 220; these results showed that AN removal efficiency moderately increased as the particle size decrease, with PAC with powder characteristics obtaining better efficiencies (≥ 85 %) at the maximum concentration (10 mg/L).

Adsorption isotherms

The Langmuir, Freundlich, and Temkin isotherms were studied to define the mechanisms of AN adsorption on AAC and

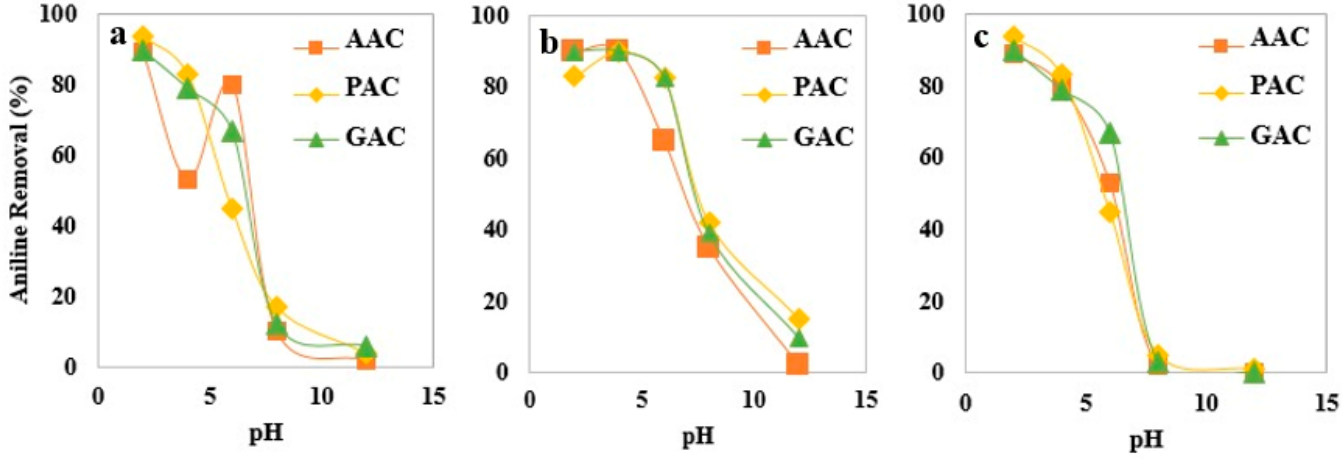


Figure 3. Effect of pH on aniline (AN) removal efficiency, at concentrations of a) 1 mg /L, b) 5 mg/L, and c) 10 mg/L.
Figure 3. Figura 3. Efecto del pH en la eficiencia de eliminación de anilina (AN) a concentraciones de: a) 1 mg /L, b) 5 mg/L, y c) 10 mg/L.

Table 2. Aniline (AN) removal with activated carbon at different pH and concentration.
Tabla 2. Remoción de anilina (AN) en carbon activado a diferentes pH y concentración.

Adsorbent	pH	C_o	C_1	Removal (%)	Variation coefficient (%)
AAC	6	1.38	0.30	80.00±0.020	9.700
	4		0.65	52.99±0.12	17.76
	2		0.14	89.33 ±0.15	7.640
PAC	6	1.19	0.66	44.68 ± 0.09	13.08
	4		0.2	83.04 ± 0.13	63.98
	2		0.08	93.70 ± 0.01	8.49
GAC	6	1.52	0.5	66.84 ± 0.09	17.96
	4		0.32	79.05 ± 0.02	7.110
	2		0.15	89.79 ± 0.01	0.740
AAC	6	5.34	1.82	65.91 ± 0.091	10.10
	4		Undetectable	>90 ± 0.28	9.40
	2		Undetectable	>90 ± 0.028	12.10
PAC	6	5.91	0.99	82.82 ± 0.14	14.05
	4		Undetectable	>90 ± 0.03	2.7
	2		Undetectable	82.96 ± 0.03	2.7
GAC	6	5.86	1.01	82.76 ± 0.43	9.21
	4		Undetectable	>90 ± 0.52	7.21
	2		Undetectable	>90 ± 1.21	13.23
AAC	6	10.72	6.23	41.88 ± 1.05	18.21
	4		5.54	48.23 ± 1.01	10.54
	2		4.32	59.70 ± 0.98	7.52
PAC	6	9.96	2.70	72.82 ± 0.14	14.05
	4		1.69	82.96 ± 0.03	2.7
	2		0.98	89.96 ± 0.03	2.7
GAC	6	9.11	4.52	50.38 ± 0.52	6.21
	4		2.21	75.74 ±0.56	5.41
	2		1.33	85.40 ± 0.46	3.21

Where C_o is the initial concentration of AN (mg/L) and C_1 is the final concentration of AN (mg/L).

commercial activated carbons (PAC and GAC) at equilibrium. Once the experimental conditions for the adsorption process were obtained, they were adjusted to the indicated models. This research shows the fit at AN concentration range of 1 to 10 mg/L and pH 2. Figure 4 shows the result of the determination coefficient as an indicator of the fit, where the value of the R^2 was 0.9901, 0.94, and 0.99 for PAC, AAC, and GAC, respectively.

Langmuir adsorption isotherm is described by the interaction forces between the adsorbed molecules. Once they occupy a site within the adsorbent, no further adsorption occurs. In this case, the GAC and PAC fit in at a percentage of 99 %, while AAC showed a slightly lower correlation (94 %). The above refers to a homogeneous adsorption process with no in-plane adsorbate transmigration to the surface (Kumar *et al*., 2007; Foo *et al*., 2010). The model explains that adsorption takes place in a monolayer and that all sites of the adsorbent material are equal or equivalent. The commercial origin of these carbons can explain this. It can be inferred that PAC and GAC may be structurally similar, so there is no interaction between molecules adsorbed on neighboring sites. When an AN molecule occupies a site in the AC, it is no longer occupied by another molecule of the same origin.

An important parameter for fitting the Langmuir model isotherms is the separation factor (R_L) (Webber *et al*., 1974). The R_L value is useful to define if the adsorption is favorable, linear, not favorable or irreversible. When R_L is 1, the adsorption is linear; R_L between 0 and 1 is favorable adsorption; irreversible is when R_L is equal to 0, while values of R_L higher than 1 are unfavorable adsorption. In this study, the following values for GAC, PAC, and AAC were of 0.1814, 0.2857, and -1.044, respectively. The above indicates that each studied adsorbent carried out favorable adsorption of AN.

The Freundlich isotherm model assumes that adsorption occurs in multilayer through a non-uniform adsorption distribution on a heterogeneous surface (Hossein *et al*., 2013). Historically, Freundlich isotherm has been applied for the adsorption of mineral carbon, showing that the percentage of adsorbate in a mass of adsorbent is not constant at different points. In this perspective, the amount adsorbed is the sum of adsorption at all sites (each with a different binding energy), being stronger at the binding sites that are occupied first, until the adsorption energy is exponential and reduces at the end of the adsorption process (Vazquez *et al*., 2023).

The following images show the fits to the Freundlich models (Figure 5), which were less than 94 % of R^2.

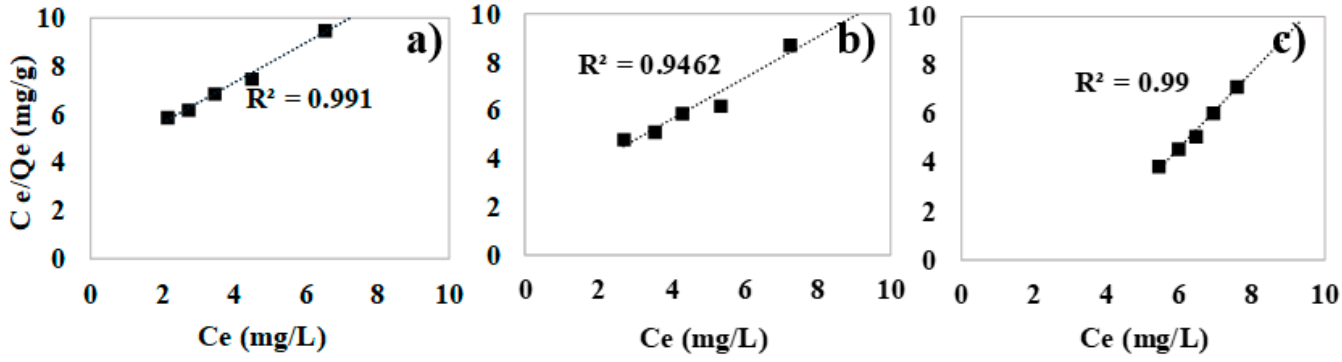


Figure 4. Adsorption isotherm with Langmuir model: a) PAC, b) AAC, and c) GAC.
Figura 4. Isoterma de adsorción con el modelo de Langmuir: a) CAP, b) CAA y c) CAG.

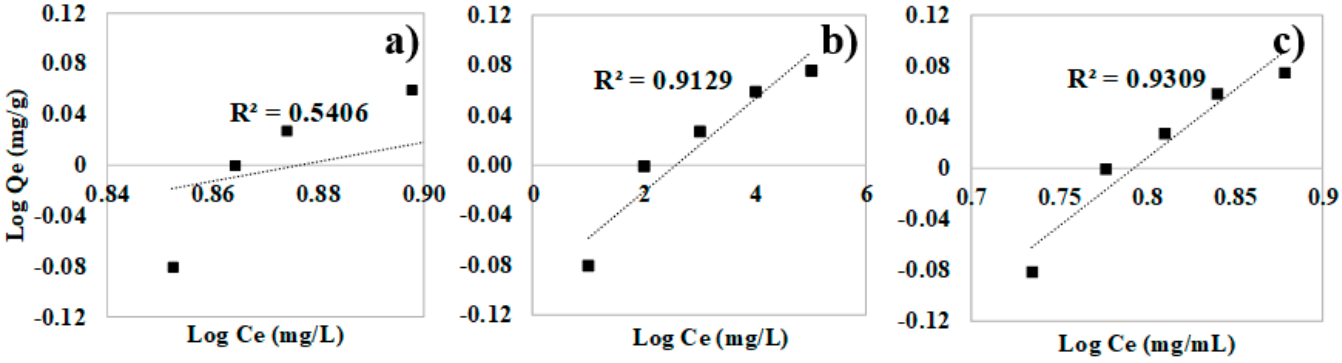


Figure 5. Adsorption isotherm with Freundlich model. a) AAC, b) PAC and c) GAC.
Figura 5. Isoterma de adsorción con el modelo de Freundlich. a) AAC, b) PAC y c) GAC.

According to Figure 5, AAC, PAC, and GAC show a smaller fit to the Freundlich model compared with Langmuir, suggesting a relationship that describes adsorption as a process that is not restricted to forming a multilayer. The results of a similar study reported by Vijan and Neagu (2012), are comparable to those of this work.

The Temkin isothermal model suggests that with increasing surface coverage, the heat of adsorption of all molecules in the layer decreases linearly (Temkin, 1940). The plot of q_e versus ln C_e allowed the isothermal constants k_T and b_T to be determined from the intercept and slope, respectively. The Temkin model presented a good fit with an R^2 close to unity for the three carbons evaluated (Figure 6). Therefore, it was one of the two models that best fit the experimental data of this study, both for the system where AAC was used and the commercial ones.

Table 3 shows the parameters of the isotherm mathematic models Langmuir, Freundlich, and Temkin for AN adsorption in AAC, PAC, and GAC. The coefficient of determination (R^2) resulting from the Langmuir model for PAC and GAC were similar, with values of 0.9897 and 0.9893, respectively. In the case of ACC, the value of R^2 (0.9462) was lower than the others mentioned before. Considering the model of Freundlich, the R^2 values for ACC, PAC, and GAC were 0.5406, 0.9129, and 0.9309, indicating that the adsorption was not related to a heterogeneous or multilayer way. The model of Temkin resulted in similar values of R^2 compared to Langmuir: 0.9786 for ACC, 0.9754 for PAC, and 0.9792 for GAC.

Table 3. Isotherm parameters for AN adsorption for different activated carbons.
Tabla 3. Parámetros de los isotermas de adsorción para AN para diferentes carbones activados.

Isotherm model	Parameters	AAC	PAC	GAC
Langmuir	q_{max} (mg/g)	1.1675	1.2070	0.6467
	k_L (L/mg)	0.4510	0.2499	-0.2139
	R^2	0.9462	0.9897	0.9893
Freundlich	k_F (mg/g)	0.1414	0.2131	0.8019
	$1/n_F$	0.7657	0.0372	1.0712
	R^2	0.5406	0.9129	0.9309
Temkin	k_T (L/g)	0.0039	0.0107	0.0493
	b_T (J/mol)	-8326.6	-7743.9	-2298.2
	R^2	0.9786	0.9754	0.9792

The parameter q_{max} indicates the maximum adsorption capacity for each type of activated carbon studied. It should be noted that PAC is the one that achieved the highest adsorption capacity of 1.2070 mg/g, then ACC with 1.1675, and finally, GAC with 0.6467 mg/g. This is in accordance with the AN removal studies, which show that PAC is the one that achieves the highest removal efficiency with 98 % confidence. Vijan and Neagu (2012) studied the influence

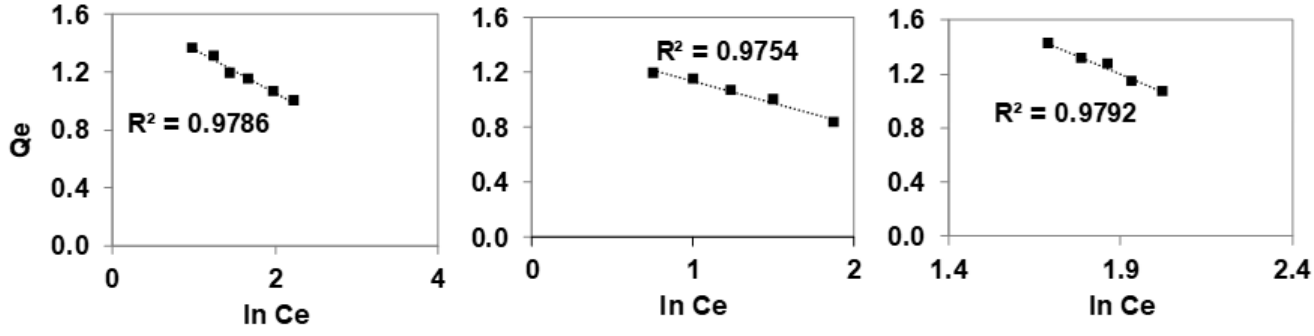


Figure 6. Adsorption isotherm with Temkin model: a) AAC, b) PAC, and c) GAC.
Figura 6. Isoterma de adsorción con el modelo de Temkin Isoterma de adsorción con el modelo de Temkin: a) AAC, b) PAC y c) GAC.

of -OH on activated carbon adsorption; the results of the equilibrium adsorption show that the isotherms were Langmuir type. The same behavior was reported by Santos and Rodrigues (2014), who studied the adsorption equilibrium of aniline onto activated carbon and found that a Langmuir and Bi-Langmuir model was the best representation. It should be recognized that the Langmuir isotherm assumes monolayer adsorption which proposes that there is no interaction between the adsorbed molecules, all of this on a surface with defined adsorption sites and uniform energy.

The utility of the Temkin isotherm is that it allows evaluating the kind of thermic reaction during the process of adsorption. When the constant b_T results are positive an exothermic adsorption process was developed, by the contrast if a negative value is obtained, the process suggested as endothermic (Benjelloun *et al*., 2021). The k_T and b_T values are shown in Table 3. Similar results were previously reported for activated carbon from *Raphia taedigera* seeds, where an endothermic adsorption process for removing methylene blue was described (Olasehinde *et al*., 2020).

Figure 7 shows a proposal for aniline mechanism of adsorption on activated carbons. It was inferred that the aniline molecules were adsorbed on activated carbon in a monolayer, favoring the order of the occupied sites in the adsorbent; this fact is related to the Langmuir model with the homogeneous kind of adsorption. The possible mechanism of adsorption was an endothermic nature; it is deduced that the adsorption reaction needs heat to be carried out, which was suggested by the Temkin model.

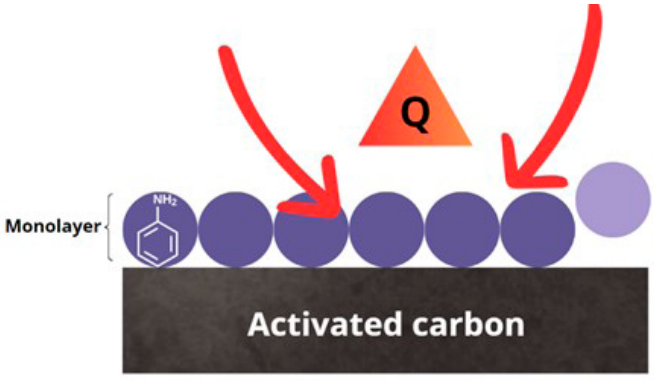


Figure 7. Possible mechanism of aniline adsorption on activated carbon (ACC, PAC, and GAC).
Figura 7. Posible mecanismo de adsorción de anilina sobre carbón activado (ACC, PAC y GAC).

CONCLUSIONS

In this research, agroforestry residues were evaluated for activated carbon synthesis in aniline removal, and the results were compared with two commercial activated carbons: granular and powdered.

Parameters such as pH influenced the adsorption of aniline, which was favored under acidic conditions (≤ 4). Instead, the higher the concentration of AN, the lower the removal efficiency of activated carbons. ACC achieved aniline removal efficiencies higher than 90 % when concentrations lower than 5 mg/L of aniline were handled. Furthermore, when the aniline concentration was increased to 10 mg/L, the efficiency of the AAC decreased by up to 30 %. The commercial activated carbons maintained their efficiency above 80 % at each concentration evaluated. The efficiency of PAC was higher than GAC and AAC at the maximum concentration of AN and acid conditions (89.96, 85.4, and 59.7 %, respectively). Langmuir and Temkin model isotherm for ACC fitted the adsorption process with an R^2 of 0.94 to 0.99; according to the RL values, the adsorption process was favorable. The above infers that the adsorption process was carried out as a monolayer in a homogeneous manner. Finally, agroforestry residues can be converted into excellent low-cost activated carbons that can economically and safely remove AN and other similar organic compounds without generating more toxic compounds than the original compound.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support of this investigation to the Instituto Tecnológico de Sonora through grant PROFAPI_2024_071.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no conflicts of interest.

REFERENCES

Abin-Bazaine, A., Trujillo, A.C. and Olmos-Marquez, M. 2022. Adsorption isotherms: Enlightenment of the phenomenon of adsorption. Wastewater Treatment, 19, 1-5. doi:10.5772/intechopen.104260.

Ahmadi S., Kord Mostafapour, F. 2017b. Adsorptive removal of bisphenol A from aqueous solutions by Pistacia Atlantica: isotherm and kinetic studies. Pharm Chem J 4:1-8. doi.org/10.18801/jstei.050117.35

Ahmadi, S., Mostafapour, F. and Bazrafshan, E. 2017. Removal of aniline and from aqueous solutions by coagulation/flocculation–flotation. Chemical Science International Journal, 18(3), 1-10. doi.org/10.9734/CSJI/2017/32016

Asencios, Y.J.O., Parreira, L.M., Perpetuo, E.A., and Rotta, A.L. 2022. Characterization of seaweeds collected from Baixada Santista litoral, and their potential uses as biosorbents of heavy metal cations. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 21(1), IA2600-IA2600. doi.org/10.24275/rmiq/IA2600

Basiri, H., Nourmoradi, H., Moghadam, F.M., Moghadam, K.F., Mohammadian, J., and Khaniabadi, Y.O. 2015. Removal of aniline as a health-toxic substance from polluted water by aloe vera waste-based activated carbon. Der pharma chemica, 7(11), 149-55.

Benito, A., Penadés, A., Lliberia, J.L., and Gonzalez-Olmos, R. 2017. Degradation pathways of aniline in aqueous solutions during electro-oxidation with BDD electrodes and UV/H2O2 treatment. Chemosphere, 166, 230-237. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.105

Benjelloun, M., Miyah, Y., Evrendilek, G.A., Zerrouq, F. and Lairini, S. 2021. Recent advances in adsorption kinetic models: their application to dye types. Arabian Journal of Chemistry, 14(4), 103031. doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103031

Bosch, D., Back, J.O., Gurtner, D., Giberti, S., Hofmann, A. and Bockreis, A. 2022. Alternative feedstock for the production of activated carbon with ZnCl2: Forestry residue biomass and waste wood. Carbon Resources Conversion, 5(4), 299-309. doi.org/10.1016/j.crcon.2022.09.001

Brasquet, C., Rousseau, B., Estrade-Szwarckopf, H. and Le Cloirec, P. 2000. Observation of activated carbon fibres with SEM and AFM correlation with adsorption data in aqueous solution. Carbon, 38(3), 407-422. https://doi.org/10.1016/S0008-6223(99)00120-7

Brazesh, B., Mousavi, S.M., Zarei, M., Ghaedi, M., Bahrani, S. and Hashemi, S.A. 2021. Biosorption. In Interface Science and Technology, (33), 587-628. Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-818805-7.00003-5

Burchell, T.D., Contescu, C.I., and Gallego, N.C. 2017. Activated carbon fibers for gas storage. Activated Carbon Fiber and Textiles, 305-335. doi:10.1016/b978-0-08-100660-3.00012-2

Castellar-Ortega, G., Mendoza C.E., Angulo M.E., Paula P.Z., Rosso B.M. and Jaramillo C.J. 2019. Equilibrium, kinetic and thermodynamic of direct blue 86 dye adsorption on activated carbon obtained from manioc husk. Revista MVZ Córdoba, 24(2), 7231-7238. doi.org/10.21897/rmvz.1700

Chaturvedi, N.K., and Katoch, S.S. 2020. Remedial technologies for aniline and aniline derivatives elimination from wastewater. Journal of Health and Pollution, 10(25), 200302. doi: 10.5696/2156-9614-10.25.200302

Deng, H., Li, Q., Huang, M., Li, A., Zhang, J., Li, Y., ... and Mo, W. 2020. Removal of Zn (II), Mn (II) and Cu (II) by adsorption onto banana stalk biochar: adsorption process and mechanisms. Water Science and Technology, 82(12), 2962-2974. doi.org/10.2166/wst.2020.543

Fakhri, A. 2017. Adsorption characteristics of graphene oxide as a solid adsorbent for aniline removal from aqueous solutions: Kinetics, thermodynamics, and mechanism studies. Journal of Saudi Chemical Society, 21, S52-S57. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.10.002

Figueroa, D., Moreno, A., and Hormaza, A. 2015. Equilibrio, termodinámica y modelos cinéticos en la adsorción de Rojo 40 sobre tuza de maíz. Revista Ingenierías Universidad de Medellín, 14(26), 105-120.

Foo, K.Y. and Hameed, B.H. 2010. An overview of dye removal via activated carbon adsorption process. Desalination and Water Treatment, 19(1-3), 255-274. doi.org/10.5004/dwt.2010.1214

Ghosh, R.K., Ray, D.P., Tewari, A., and Das, I. 2021. Removal of textile dyes from water by jute stick activated carbon: process optimization and isotherm studies. International Journal of Environmental Science and Technology, 18(9), 2747-2764. doi.org/10.1007/s13762-020-03003-5

Guo, L., Li, G., Liu, J., Yin, P., and Li, Q. 2009. Adsorption of aniline on cross-linked starch sulfate from aqueous solution. Industrial & engineering chemistry research, 48(23), 10657-10663. doi.org/10.1021/ie9010782

Guo, S., Wang, Z., Wu, S., Cai, Y., Zhang, J., Lou, C., and Zhao, W. 2024. Modification of the adsorption model for the mixture of odor compounds and VOCs on activated Carbon: Insights from pore size distribution. Separation and Purification Technology, 339, 126669. doi.org/10.1016/j.seppur.2024.126669

Hameed, B.H., and Rahman, A.A. 2008. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon prepared from biomass material. Journal of hazardous materials, 160(2-3), 576-581. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.028

Hossein, S.K., Hossein, M.M., Reza, A.M., Hassan, H., Mohammad, T., and Maryam, N. 2013. Pre-concentration and equilibrium isotherm studies of rhodium (III) in environmental water samples. International Journal of Engineering Practical Research, 2(4), 148-155.

Huang, D., Zhang, G., Yi, J., Cheng, M., Lai, C., Xu, P., ... and Chen, S. 2021. Progress and challenges of metal-organic frameworks-based materials for SR-AOPs applications in water treatment. Chemosphere, 263, 127672. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127672

Iglesias, O., Fernández de Dios, M.A., Pazos, M., and Sanromán, M.A. 2013. Using iron-loaded sepiolite obtained by adsorption as a catalyst in the electro-Fenton oxidation of Reactive Black 5. Environmental Science and Pollution Research, 20, 5983-5993. doi.org/10.1007/s11356-013-1610-4

Khaniabadi, Y.O., Heydari, R., Nourmoradi, H., Basiri, H., and Basiri, H. 2016. Low-cost sorbent for the removal of aniline and methyl orange from liquid-phase: aloe vera leaves wastes. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 68, 90-98. doi.org/10.1016/j.jtice.2016.09.025

Khoshnamvand, N., Ahmadi, S., and Mostafapour, F. K. 2017. Kinetic and isotherm studies on ciprofloxacin an adsorption using magnesium oxide nanopartices. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7(11), 079-083. doi:10.7324/JAPS.2017.71112

Kord Mostafapour, F., Ahmadi, Sh., Balarak, D. and Rahdar, S. 2016. Comparison of dissolved air flotation process Function for aniline and penicillin G removal from aqueous solutions. J. Hamadan Univ. Med. Sci. 82(4), 203-209. doi 10.21859/hums-230410.

Kumar, A., Kumar, S., Kumar, S., and Gupta, D.V. 2007. Adsorption of phenol and 4-nitrophenol on granular activated carbon in basal salt medium: equilibrium and kinetics. Journal of hazardous materials, 147(1-2), 155-166. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.062

Liu, B., Du, C., Chen, J.J., Zhai, J.Y., Wang, Y., and Li, H.L. 2021. Preparation of well-developed mesoporous activated carbon fibers from plant pulp fibers and its adsorption of methylene blue from solution. Chemical Physics Letters, 771, 138535. doi.org/10.1016/j.cplett.2021.138535.

Liu, Y.B., Qu, D., Wen, Y.J., and Ren, H.J. 2015. Low-temperature biodegradation of aniline by freely suspended and magnetic modified Pseudomonas migulae AN-1. Applied microbiology and biotechnology, 99, 5317-5326. doi.org/10.1007/s00253-015-6399-2

Lu, D., Xu, S., Qiu, W., Sun, Y., Liu, X., Yang, J., and Ma, J. 2020. Adsorption and desorption behaviors of antibiotic ciprofloxacin on functionalized spherical MCM-41 for water treatment. Journal of Cleaner Production, 264: 121644. doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121644.

Mamaghani, Z.G., Hawboldt, K.A., and MacQuarrie, S. 2023. Adsorption of CO_2 using biochar-review of the impact of gas mixtures and water on adsorption. Journal of Environmental Chemical Engineering, 11(3), 109643. doi.org/10.1016/j.jece.2023.109643

Muñoz, Y., Arriagada, R., Soto-Garrido, G., and García, R. 2003. Phosphoric and boric acid activation of pine sawdust. Journal

of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 78(12), 1252-1258.doi.org/10.1002/jctb.923

Olasehinde, E.F., Abegunde, S.M., and Adebayo, M.A. 2020. Adsorption isotherms, kinetics and thermodynamic studies of methylene blue dye removal using Raphia taedigera seed activated carbon. doi 10.22124/cjes.2020.4279

Padilla-Ortega, E., Leyva-Ramos, R., and Flores-Cano, J.V. 2013. Binary adsorption of heavy metals from aqueous solution onto natural clays. Chemical Engineering Journal, 225, 535-546. doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.011

Resasco, D.E., Crossley, S.P., Wang, B., and White, J.L. 2021. Interaction of water with zeolites: a review. Catalysis Reviews, 63(2), 302-362. doi.org/10.1080/01614940.2021.1948301

Rosales, E., Ferreira, L., Sanromán, M.Á., Tavares, T., and Pazos, M. 2015. Enhanced selective metal adsorption on optimised agroforestry waste mixtures. Bioresource Technology, 182, 41-49. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.094

Santos, M.P., and Rodrigues, A.E. 2014. Adsorption equilibrium and fixed bed adsorption of aniline onto polymeric resin and activated carbons. Separation Science and Technology, 49(3), 335-344. doi.org/10.1080/01496395.2013.852226

Sharma, G., Sharma, S., Kumar, A., Lai, C.W., Naushad, M., Shehnaz, ... and Stadler, F.J. 2022. Activated carbon as superadsorbent and sustainable material for diverse applications. Adsorption Science & Technology, 2022, 4184809. doi.org/10.1155/2022/4184809

Shurvell, H.F. 2006. Spectra–structure correlations in the mid- and far-infrared. Handbook of vibrational spectroscopy. doi:10.1002/9780470027325.s4101

Srivastava, A., Gupta, B., Majumder, A., Gupta, A.K., and Nimbhorkar, S.K. 2021. A comprehensive review on the synthesis, performance, modifications, and regeneration of activated carbon for the adsorptive removal of various water pollutants. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(5), 106177. doi.org/10.1016/j.jece.2021.106177

Sun, Y., Wang, T., Sun, X., Bai, L., Han, C., and Zhang, P. 2021. The potential of biochar and lignin-based adsorbents for wastewater treatment: Comparison, mechanism, and application—A review. Industrial Crops and Products, 166, 113473. doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113473

Tay, T., Ucar, S., and Karagöz, S. 2009. Preparation and characterization of activated carbon from waste biomass. Journal of hazardous materials, 165(1-3), 481-485. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.011

Temkin, M.I. 1940. Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts. Acta Physiochimica URSS 12, 327-356.

Tetteh, I.K., Issahaku, I., and Tetteh, A.Y. 2024. Recent advances in synthesis, characterization, and environmental applications of activated carbons and other carbon derivatives. Carbon Trends, 100328. doi.org/10.1016/j.cartre.2024.100328

Varghese, S.M., Chowdhury, A.R., Arnepalli, D.N., and Rao, G.R. 2024. Crosslinked hydrogel-derived carbons activated by trace amounts of aqueous potassium carbonate for carbon dioxide adsorption. Bioresource Technology, 403, 130851. doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130851

Vázquez-Sánchez, A.Y., Lima, E.C., Abatal, M., Tariq, R., Santiago, A.A., Alfonso, I., ... and Vazquez-Olmos, A.R. 2023. Biosorption of Pb (II) using natural and treated *Ardisia compressa* K. leaves: Simulation framework extended through the application of artificial neural network and genetic algorithm. Molecules, 28(17), 6387. doi.org/10.3390/molecules28176387

Vijan, L.E., and Neagu, M. 2012. Adsorption isotherms of phenol and aniline on activated carbon. Revue Roumaine de Chimie, 57(2), 85-93.

Weber, T.W., and Chakravorti, R.K. 1974. Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. AIChE Journal, 20(2), 228-238. doi.org/10.1002/aic.690200204

Wu, C.D., Zhang, J.Y., Wang, L., and He, M.H. 2013. Removal of aniline and phenol from water using raw and aluminum hydroxide-modified diatomite. Water science and technology, 67(7), 1620-1626. doi.org/10.2166/wst.2013.038

Yakout, S.M., and Ali, M.S. 2015. Removal of the hazardous crystal violet dye by adsorption on corncob-based and phosphoric acid-activated carbon. Particulate Science and Technology, 33(6), 621-625. doi.org/10.1080/02726351.2015.1016642

Yan, Z., Gu, Y., Wang, X., Hu, Y., and Li, X. 2021. Degradation of aniline by ferrous ions activated persulfate: impacts, mechanisms, and by-products. Chemosphere, 268, 129237. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129237

Yunus, Z. M., Al-Gheethi, A., Othman, N., Hamdan, R., and Ruslan, N.N. 2022. Advanced methods for activated carbon from agriculture wastes; a comprehensive review. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(1), 134-158. doi.org/10.1080/03067319.2020.1717477

Zhou, Y., Lu, J., Zhou, Y., and Liu, Y. 2019. Recent advances for dyes removal using novel adsorbents: a review. Environmental pollution, 252, 352-365. doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.072

Zhu, R., Yu, Q., Li, M., Zhao, H., Jin, S., Huang, Y., and Chen, J. 2021. Analysis of factors influencing pore structure development of agricultural and forestry waste-derived activated carbon for adsorption application in gas and liquid phases: A review. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(5), 105905. doi.org/10.1016/j.jece.2021.105905.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Caracterización química de frutos de mangostán *Garcinia mangostana* L. cultivados en Tuxtla Chico, Chiapas, México

Chemical characterization of mangosteen fruits *Garcinia mangostana* L. cultivated in Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico

Alexis Eduardo Martínez-Rodríguez[1], Juan Manuel Villarreal-Fuentes[2*], Pedro Antionio Moscoso-Ramírez[3], Irán Alia-Tejacal[4] and Francisco Guevara-Hernández[1]

[1] Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Ocozocoautla – Villaflores km 84.5. Apartado postal #78, Villaflores, Chiapas, México. C.P. 30470.
[2] Facutad de Ciencias Agrícolas, Campus IV, Universidad Autonóma de Chiapas. Entronque Carretera Costera y Huehuetán Pueblo, SN, Huehuetán, Chiapas, México. C.P. 30660.
[3] Colegio Postgraduados Campus Tabasco, Cárdenas, Tabasco, México.
[4] Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad, 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209.

RESUMEN

El fruto de *Garcinia mangostana* contiene biomoléculas con gran capacidad antioxidante, generando interés de la industria farmacéutica. El presente estudio describe características químicas del fruto de mangostán cultivado en Tuxtla Chico, Chiapas. Los frutos fueron madurados a 23° C, 70 % H.R., y se analizaron a los 0, 3, 6, 9 y 12 d después de su cosecha. Los frutos presentaron altas cantidades de azúcares (150 mg/g p.f. a 280 mg/g p.f.) el cual los árboles 26 y 219 presentaron el pico más alto el día 12. Los solubles totales alcanzaron valores máximos el día inicial (20.1 °Brix) en el árbol 26, el árbol 94 registró la mayor media (19.5 °Brix). Los compuestos fenólicos se cuantificaron en 17. 76 µg/g y 49.21 µg/g en pulpa y cáscara, respectivamente; corroborando que la cascara, la cual se desecha, cuenta con moléculas potenciales para su explotación. La actividad antioxidante en pulpa incrementó durante la poscosecha en los métodos aplicados: 1,1-difenil, 2-picrylhidrazilo (DPPH), 2,2' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y Capacidad de reducción férrica de plasma (FRAP), siendo FRAP el que mayor actividad de captura presentó (178 mg EAA/100 g), donde el árbol 284 registró la media más alta (111.08 mg/EAA 100 g), comprobando que los frutos de *G. mangostana* cultivados en Tuxtla Chico, Chiapas, muestran potencial antioxidante.

Palabras clave: *Garcinia mangostana*, caracterización, química.

ABSTRACT

Garcinia mangostana fruit contains biomolecules with great antioxidant capacity, generating interest in the pharmaceutical industry. The present study describes chemical characteristics of the mangosteen fruit cultivated in Tuxtla Chico, Chiapas. The fruits were ripened at 23° C, 70 % R.H., and were analyzed at 0, 3, 6, 9 and 12 days after harvest. The fruits presented high amounts of sugars (150 mg/g w.f. to 280 mg/g w.f.) of which trees 26 and 219 presented the highest peak on day 12. Total solubles reached maximum values on initial day (20.1 °Brix) in tree 26; tree 94 registered the highest average (19.5 °Brix). Phenolic compounds were quantified at 17.76 µg/g and 49.21 µg/g in pulp and peel, respectively; corroborating that the peel, which is discarded, has potential molecules for exploitation. The antioxidant activity in pulp increased during post-harvest in the applied methods: 1,diphenyl, 2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS) and Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), being FRAP the one that presented the highest capture activity (178 mg EAA/100 g), where tree 284 registered the highest average (111.08 mg EAA/100 g), proving that *G. mangostana* fruits grown in Tuxtla Chico, Chiapas, show antioxidant potential.

Keywords: *Garcinia mangostana*, characterization, chemical.

INTRODUCCIÓN

El fruto de mangostán *G. mangostana*, es una fruta climatérica de origen tropical de la familia *Clusiaceae* (*Guttiferae*) cultivado en el sureste asiático (R. Parijadi *et al*., 2019; Rizaldy *et al*., 2022). En Centro y Sur América existen escasas plantaciones comerciales, debido a que es un frutal de producción tardía para la primera cosecha (8 a 10 años) (Díaz *et al*., 2011). No obstante, es una especie promisoria por su excelente calidad, alta capacidad antioxidante (Nawawi *et al*., 2023) y alta demanda en los mercados nacionales e internacionales (FAO, 2022). El mangostán fue introducido a México en la década de los 60´s en el Campo Experimental "El Palmar" Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Díaz y Picón, 2007). En los 90´s se iniciaron actividades de investigación sobre este frutal, por considerárse una alternativa productiva para las regiones tropicales húmedas del país. Esta visión sobre las perspectivas del mangostán en México ha sido válida ya que en los últimos años se cultivan en los estados de Chiapas, Veracruz y Jalisco (Rueda *et al*., 2014) con una superficie sembrada aproximada de 840 ha con tendencia creciente (Díaz y Díaz, 2011) donde el 98 % se localiza en la región del Soconusco con plantaciones

*Autor para correspondencia: Juan Manuel Villarreal Fuentes
Correo-e: jmfv@unach.mx
Recibido: 9 de agosto de 2024
Aceptado: 15 de noviembre de 2024
Publicado: 17 de diciembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2410

recientes (2013-2017) que iniciaron su vida productiva en el periodo 2019-2023 (Díaz *et al*., 2019). En el año 2018 en el campo experimental Rosario Izapa en Tuxtla Chico, se reportaron 25 226 frutos (cosechados a los cuatro primeros ciclos de producción), con un promedio de 146 frutos por árbol. Los resultados demuestran que en sus etapas iniciales el rendimiento del mangostán en el área de estudio es similar y en algunos casos superior al obtenido en otros países productores como Indonesia y Malasia (Díaz *et al*., 2019), lo que confiere a nuestro país una alta competitividad en los mercados internacionales de mangostán. El pericarpio del fruto de *G. mangostana* contiene altas concentraciones de antioxidantes (Andayani *et al*., 2020) con capacidad anticancerígena al generar un efecto protector en la prevención en los procesos degenerativos de enfermedades cancerígenas (Nardini y Garaguso, 2020) además, previene enfermedades cardiovasculares (Sari *et al*., 2021), diabetes (Yani *et al*., 2021), disminuye la obesidad (John *et al*., 2021) y tiene potencial para prevenir la pérdida de memoria y enfermedades neurodegenerativas (Tiang *et al*., 2020).

Aunque en México se ha incrementado la superficie del cultivo, escasa investigación se ha realizado en La Región del Soconusco, Chiapas sobre las características químicas del fruto, por lo que se plantea que los frutos del mangostán procedentes del municipio de Tuxtla Chico, Chiapas presentan características nutraceúticas y calidad importantes que son demandadas por el mercado. Por tanto, el objetivo de la investigación fue analizar las características de calidad y nutraceúticas de frutos de algunas selecciones de mangostán (*G. mangostana*) en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, para ofrecer materiales superiores que ofrezcan valor agregado a la industria alimenticia, farmacéutica, al consumidor y a futuros programas de mejoramiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos analizados se cosecharon del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), localizado en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, el cual se encuentra a la Latitud Norte 14° 56' y Longitud Oeste 92° 16'. La región presenta una altitud de 320 m con una temperatura media anual de 25.5 °C y una precipitación anual de 3544.5 hasta 5000 mm (INEGI, 2010); dando inicio en el mes de diciembre del 2020 y finalizando en el mes de noviembre del 2021.

Se seleccionaron 10 árboles considerados mejores para su evaluación poscosecha (26, 93, 94, 190, 214, 219, 277, 282, 283 y 284) de una superficie de 2 hectáreas detectando el periodo de fructificación. En cada árbol se cosecharon 25 frutos en etapa seis de maduración (Palapol *et al*., 2009) que corresponde a un color negro púrpura; la unidad experimental fue un fruto con cinco repeticiones y el diseño experimental fue completamente al azar. La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Chiapas, los frutos se colocaron en una cámara de maduración a 23° C y 70 % de humedad relativa. Se realizaron análisis por duplicado a los 0, 3, 6, 9 y 12 días después de su cosecha midiendo las siguientes variables: sólidos solubles totales, compuestos fenólicos en pulpa y cáscara, azúcares totales, acidez titulable y capacidad antioxidante por los métodos: DPPH, ABTS y FRAP.

Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (sst) se determinaron a partir de dos gotas de jugo de mangostán extraídas de la pulpa de cada uno de los frutos y se midió con un refractómetro (ATAGO PAL-1®, Japón) los resultados se reportaron en unidades de °Brix.

Acidez titulable

La acidez titulable se realizó de acuerdo con el método de la Association of Official Analiytical Chemistry (A.O.A.C., 1990) donde cinco gramos de pulpa se homogenizaron con 10 mL de agua destilada con ayuda de un UltraTurrax (IKA, USA), se licuaron y filtraron con papel filtro Núm. 8; se tomaron 20 mL del filtrado, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron tres gotas de Fenolftaleína (2 %), esta mezcla se tituló con hidróxido de sodio (NaOH 0.1 N). Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de ácido málico.

Azúcares totales

Se evaluó mediante el método de Antrona (Witham *et al*., 1971). Una mezcla de 0.5 g de pulpa y 60 mL de etanol al 80 % se llevó a ebullición por cinco min y se mantuvieron en refrigeración por 15 días. Posteriormente, se tomó un mL del homogenizado y se evaporó, posteriormente se adicionaron 50 mL de agua destilada, tomando un mL al cual se le adicionaron tres mL de agua destilada y seis mL de la solución de Antrona (0.04 %), manteniendo los tubos en baño de hielo; cada tubo se agitó y colocó en agua en ebullición por tres min para posteriormente sumergirse en baño de hielo y se tomar las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro (HACH DR 5000 ®, EUA) a 600 nm. Los resultados se expresaron en mg/g de p.f.

Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en pulpa y cáscara

Se realizó conforme a la metodología de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al*., 1999). Se pesó un g de pulpa de cada fruto y se homogenizó en un tubo de ensayo con ayuda de un Ultra Turrax (IKA®, USA), con 15 mL de agua destilada y posteriormente se filtró. Se tomó 0.5 mL del filtrado y se mezcló con 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10), después de cinco min se adicionaron dos mL de carbonato de sodio (7.5 %p/v) y se dejó reposar durante dos horas. Posteriormente se obtuvo la absorbancia mediante las lecturas de las muestras que se realizaron en un espectrofotómetro (HACH DR 5000®, USA) a 760 nm. Con los valores de absorbancia obtenidos se estimó el contenido de fenoles totales expresados en µg (EAG)/g de peso fresco. Para la determinación de fenoles totales en cáscara se realizó la misma metodología usando 0.1 g.

La actividad antioxidante por el método de 1,1-difenil, 2-picrylhidrazilo (DPPH) se realizó con el filtrado de los compuestos fenólicos y se siguió la metodología descrita por Brand *et al*. (1995) se tomaron 0.10 mL y tres mL de la solución DPPH (6.1 x 10^{-5} M de DPPH disuelto en metanol), después de 30 min de reposo en oscuridad se leyó el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro (HACH DR 5000 ®, USA) a 517 nm. La actividad antioxidante se determinó usando una curva estándar con ácido ascórbico (0-100 mg/L) y los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/100 g de peso fresco.

La determinación de la actividad antioxidante por el método de 2,2' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) se realizó al mezclar 0.05 mL de la solución de ácido ascórbico con tres mL de ABTS (7 mM y persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) a 2.45 mM, se mezcló 1:1, reposó 16 horas y se diluyó con etanol 20 % hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/100 g de peso fresco (Re *et al*., 1999).

Finalmente, la capacidad antioxidante de reducción férrica (FRAP), se determinó con la metodología de Benzie y Strain (1996), al mezclar dos g de pulpa con 13 mL de agua destilada, se filtró y del filtrado se tomó 0.08 mL más 0.02 mL de agua destilada, posteriormente se le adicionaron 1.90 mL de FRAP (TPTZ $FeCl_3$ y tampón acetato), se dejó reaccionar durante 30 min a 37 °C. transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro (HACH DR 5000 ®). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes ácido ascórbico (EAA)/100 g de peso fresco.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron graficados en el software SigmaPlot v. 14.2 y se realizó análisis de varianza entre los árboles en cada una de las variables evaluadas con el paquete estadístico SAS v. 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólidos solubles totales (sst)

El contenido de sst durante el periodo de evaluación estuvo entre 17.08 y 20.1 %. Durante la maduración los frutos de mangostán provenientes de diferentes árboles mostraron comportamiento diverso (Figura 1). Así, en los frutos de los árboles 26, 93, 190, 219, 277, 282 y 284 los sst disminuyeron los primeros nueve días y después se incrementaron ligeramente; en tanto que los frutos de los árboles 94, 214 y 283 los sst se mantuvieron o incrementaron significativamente durante la maduración (Figura 1). En la literatura se indica que los sst se incrementan en los frutos de mangostán durante la maduración cuando se cosechan en la etapa de maduración 1 (color de la epidermis verde amarillenta con 5 a 10 % de manchas rojizas) (Manurakchinakorn *et al*., 2008; Palapol *et al*., 2009) y cuando se cosecha en etapa de maduración 5 (purpura rojiza) los sólidos solubles totales se mantienen o disminuyen (Castro *et al*., 2012; Mustafa *et al*., 2018). Por lo que cuando se cosecharon los frutos del presente experimento ya habían alcanzado su máxima etapa de maduración (Etapa 5-6), debido a que cuando los frutos se cosechan entre la etapa 3 (rosa-rojizo) y 6 (púrpura oscura) el contenido de sólidos solubles totales es entre 16.3 y 17.4 %, después de unos días incrementan entre 17.4 y 17.5 % (Ketsa

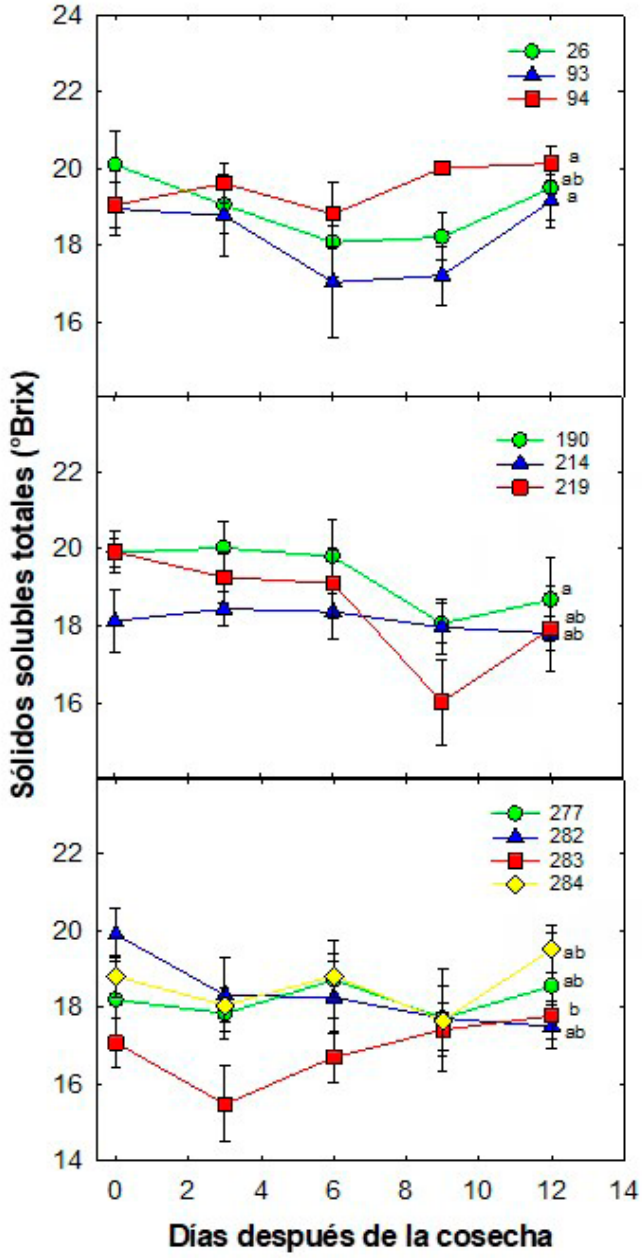


Figura 1. Dinámica de sólidos solubles totales (°Brix) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes para cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05)**;** la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 1. Total soluble solids dynamics (°Brix) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters for each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

y Paull, 2011). Sin embargo, en Filipinas e Indonesia se han documentado frutos de hasta 20 % (Mulyono *et al*., 2021; Tac-an *et al*., 2021).

Lo anterior sugiere que en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas se pueden producir frutos de mangostán con alto contenido de sst que son muy atractivos para la industria y el comercio nacional e internacional, ya que, durante la evaluación del día seis después de cosecha (él fruto llegó a su máxima etapa de maduración, etapa 6) se obtuvieron cifras de hasta 20.1 %.

Acidez titulable

Durante el periodo de evaluación la acidez titulable del mangostán se determinó entre 2.5 % y 3.5 % (Figura 2). Sumiasih *et al*. (2019), al cosechar frutos de mangostán en etapas 1 (epidermis del fruto verde amarillento con manchas rojizas) a 4 (frutos rojos) la acidez titulable se cuantificó entre 0.60 y 0.74 % y una vez almacenados a temperatura ambiente la acidez disminuyó hasta 0.54 – 0.55 % después de 15 días. En los frutos evaluados la acidez titulable mostró máximos a los 3, 6 y 9 días en los árboles 26, 93, 94, 190, 214, 219 y 284, en tanto que los frutos de los árboles 277, 282 y 283 la acidez titulable disminuyó constantemente (Figura 2). Esto se atribuye a diferencias en la maduración de los frutos, ya que el índice de cosecha de los frutos de mangostán es el color de la epidermis, un parámetro subjetivo y que puede ocasionar heterogeneidad en la maduración. Lo que si se considera importante es que la acidez titulable de los frutos en el Soconusco es significativamente mayor, ya que durante la maduración del mangostán se indica que inicia en 0.77 % alcanzando un máximo de 0.84 % y volviendo a disminuir a 0.73 % (Palapol *et al*., 2009).

Azúcares totales

Los azúcares totales se incrementaron durante la maduración con una variación de entre 150 mg/g p.f. a 280 mg/g p.f. (Figura 3). Wongs-Aree y Noichinda (2022) indican que los azúcares reductores se incrementan significativamente en el arilo de la etapa roja a la etapa roja púrpura. El fruto de *G. mangostana* en Tuxtla Chico alcanzó en promedio valores de 21.5 % de azúcares totales que es mayor que los valores entre 17 y 18 % reportado por otros autores en otros países del mundo (Kanchanapom y Kanchanapom, 1998; Tongdee y Suwanagul, 1989).

Compuestos fenólicos en pulpa

Los compuestos fenólicos se incrementaron después de la cosecha alcanzando máximos a los 3, 6 y 9 días después de la cosecha y posteriormente disminuir (Figura 4). Este comportamiento se observó en todos los árboles a excepción del árbol 284 donde los compuestos fenólicos se incrementaron constantemente durante 12 días, de 17.2 µg/g p.f. hasta 24.3 µg/g p.f. (Figura 4). No se detectaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre los árboles evaluados, el contenido de estas moléculas fue entre 10.0

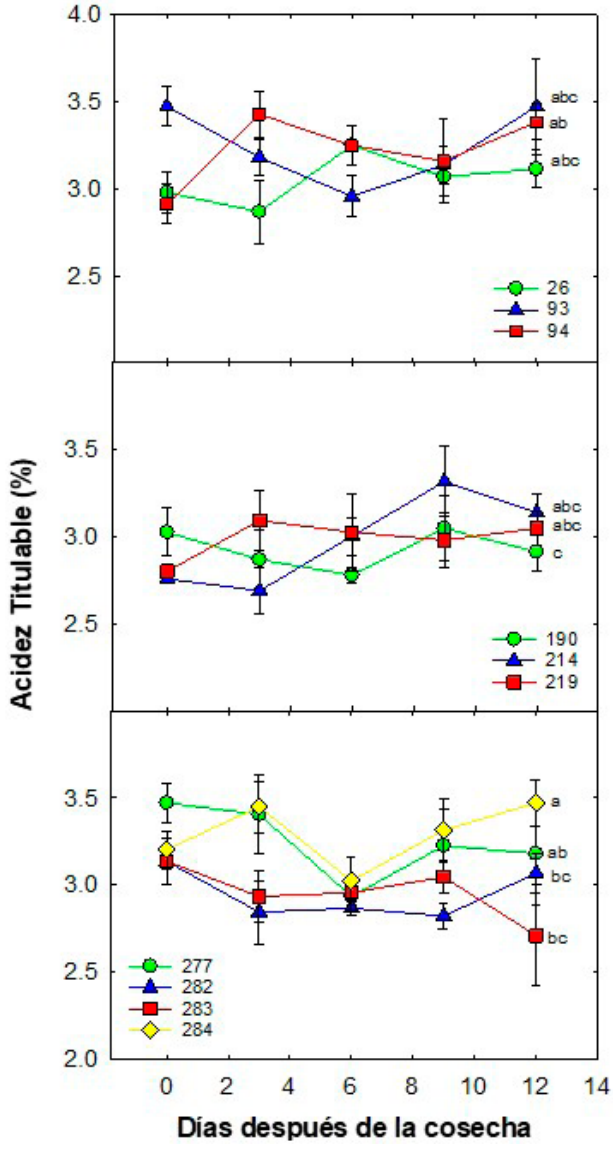


Figura 2. Dinámica de acidez titulable (%) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05); la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 2. Titratable acidity dynamics (%) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

µg/g de p.f. a 25.80 µg/g de p.f (Figura 4). Muzykiewicz *et al*. (2020) reportan que la pulpa del mangostán contiene 1.83 mg/g de ácidos fenólicos, que representa 100 veces más que lo encontrado en el presente trabajo. Las diferencias se atribuyen a los métodos de cuantificación utilizados en ambos trabajos.

Compuestos fenólicos en cáscara

Los compuestos fenólicos en el epicarpio del fruto se incrementaron durante la maduración, alcanzando máximos a

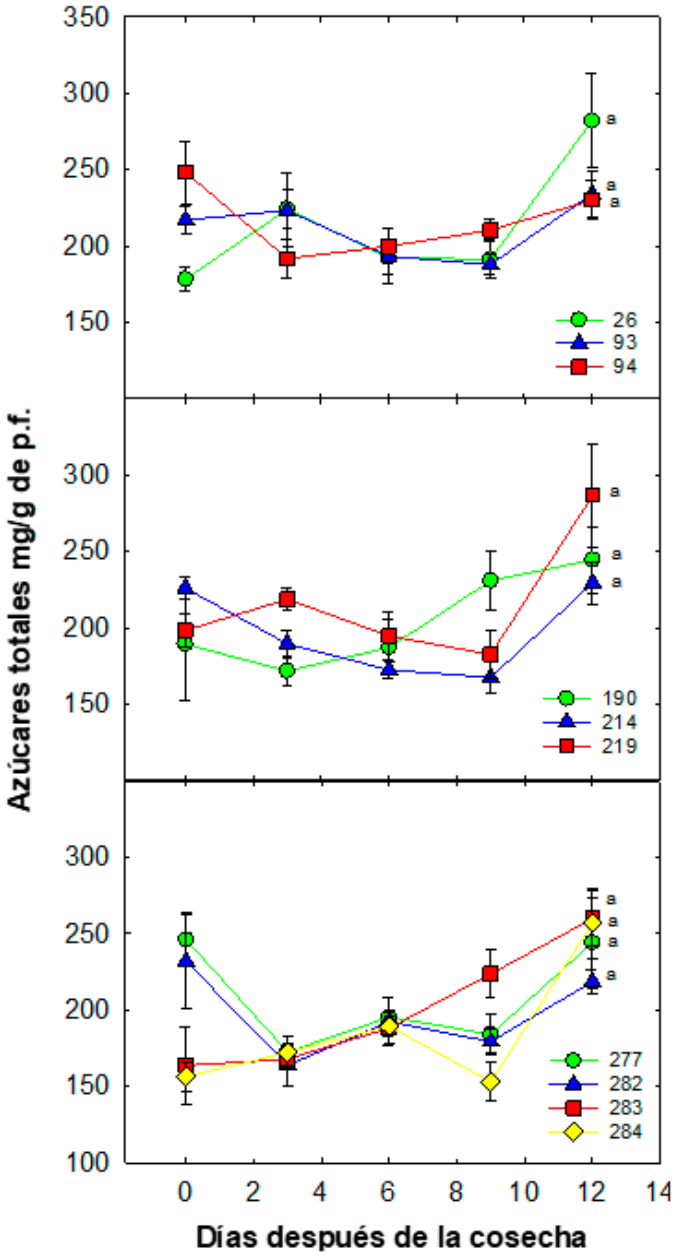


Figura 3. Dinámica de azúcares totales (mg/g de p.f.) durante la maduración de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05)**;** la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 3. Total sugars dynamics (mg/g of f.w.) during ripening of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

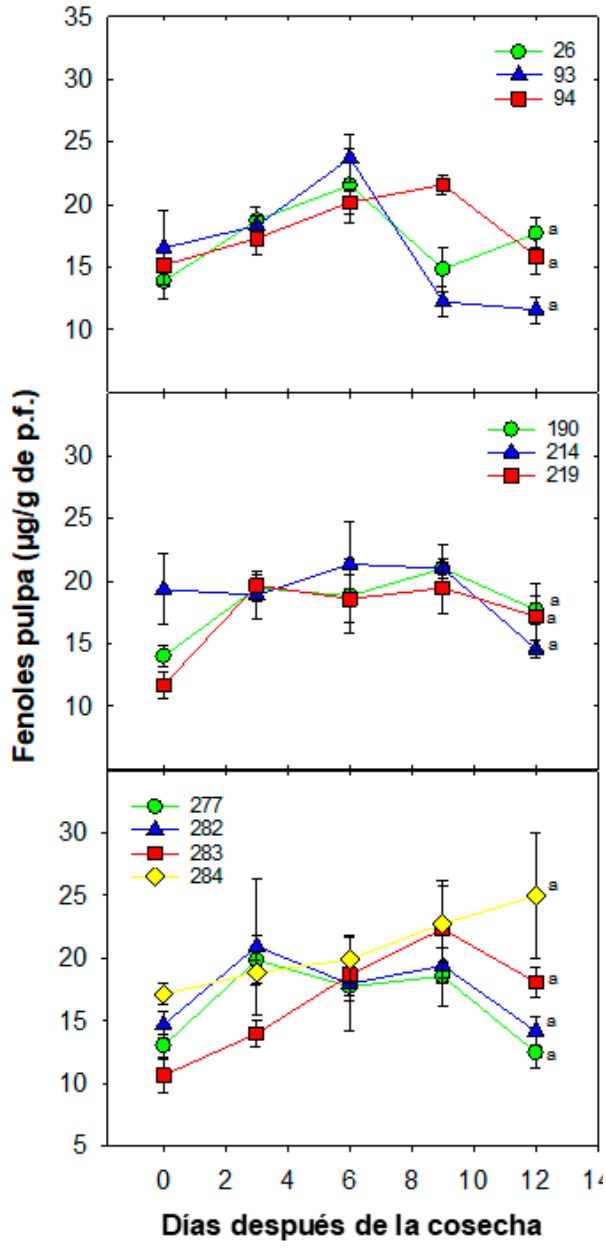


Figura 4. Dinámica de fenoles pulpa (µg/g de p.f.) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05); la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 4. Pulp phenols dynamics (µg/g of f.w.) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

los 3 días (árbol 190 y 282), 6 días (arboles 93, 94 y 277), 9 días (arboles 26, 282, 283 y 284) y 12 días (arboles 190 y 219) y posteriormente disminuyen (Figura 5). Suttirak y Manurakchinakorn (2014) indican que durante la maduración de los frutos de Mangostán el contenido total de compuestos fenólicos disminuye. En la epidermis de los frutos de Mangostán se cuantificaron entre 22.0 µg/g de p.f. a 87.0 µg/g de p.f. (Figura 5). Diversos autores indican que en la epidermis de Mangostán se tienen compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos y xanthonas (Rohman *et al*., 2019)

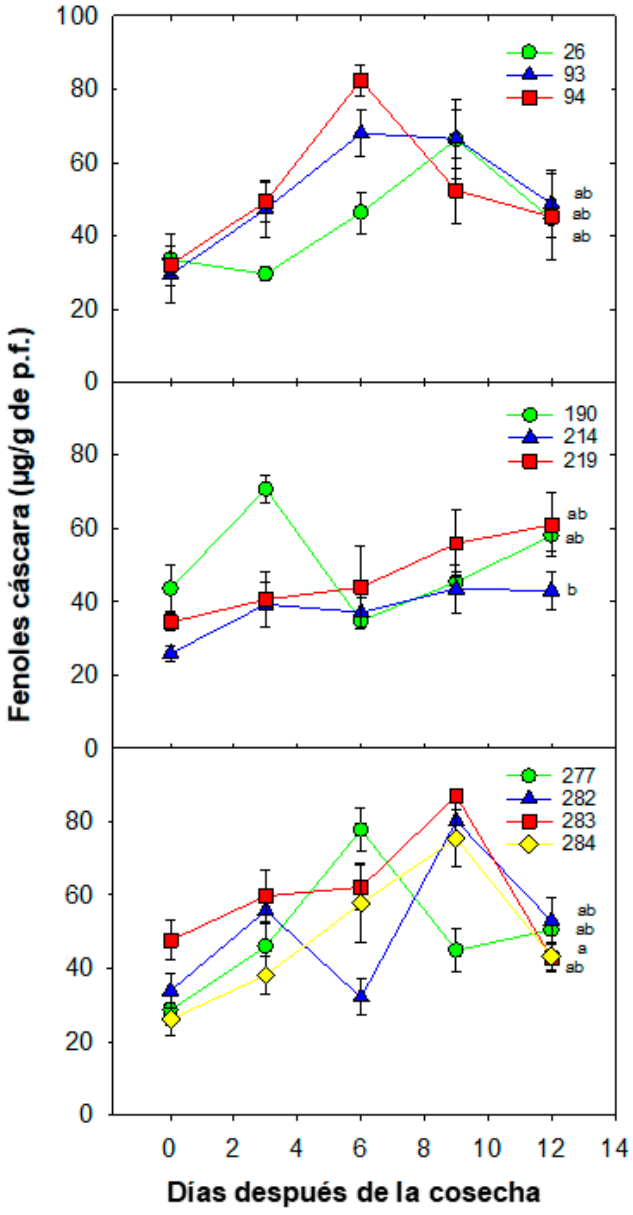


Figura 5. Dinámica de compuestos fenólicos en cáscara (µg/g de p.f.) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05); la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.
Figure 5. Phenolic compounds dynamics in the peel (µg/g of f.w.) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

Con los resultados obtenidos de compuestos fenólicos en pulpa y cáscara podemos corroborar que el mayor contenido en el fruto de mangostán se presenta en su cáscara y por cantidades relevantes con relación a su pulpa. Lo anterior fortalece los hallazgos por Nawawi *et al*. (2023), quien de igual forma registró mayores cantidades de polifenoles en cáscara de mangostán que en la pulpa. Mosquera *et al*. (2020) reportaron entre 50 µg/mg extracto y 125 µg/mg extracto, resultados comparables a esta investigación.

Según Nauman y Johnson (2022), el mangostán tiene una clase única de fitoquímicos conocidos como xantonas que se han informado que muestran importantes actividades antioxidantes. Díaz *et al*. (2011), mencionan que la actividad antioxidante, bacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral y antileucémica en *G. mangostana* ha sido motivo en los últimos años de muchos estudios farmacológicos y clínicos reportados por diversos autores desde 2007, esto lo ha llevado a convertirse en el tercer recurso botánico más vendido en Estados Unidos (Díaz *et al*., 2011). Se trata del recurso natural que posee mayor cantidad de xantonas, conteniendo más de 30. La facilidad que presenta el mangostán es que todas las xantonas se encuentran, en su mayoría, en el pericarpio y son de fácil extracción (Larasati *et al*., 2020). Como se ha mencionado antes, en el Soconusco, Chiapas se presenta un alto potencial de producción para el cultivo de mangostán, podría llegar a ser de importancia económica para el estado de Chiapas y de alto prestigio en la agroindustria y la industria farmacéutica por sus altos contenidos de compuestos fenólicos.

Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH

La actividad antioxidante evaluada por el método de DPPH se incrementó durante la poscosecha de los frutos de Mangostán alcanzando máximos entre los 6 y 9 días después de la cosecha, similar comportamiento se observó en todos los frutos de los árboles evaluados, a excepción de los árboles 26, 190 y 277 donde la actividad se incrementó al tercer día (Figura 6). La actividad pro DPPH fue entre 30.0 mg EAA/100 g y 85.0 mg EAA/100 g, sin detectarse diferencias estadísticas entre las selecciones (Figura 6).

La capacidad antioxidante con el radical DPPH resultó moderadamente bajo comparado con los resultados con FRAP, esto puede obedecer a los diferentes mecanismos de acción de los compuestos que presentan actividad antioxidante en el extracto y a su naturaleza química, entre otros (Daza *et al*., 2012). Chew y Lim (2018), en Malasia y Muzykiewicz *et al*. (2020), en Polonia, presentaron valores en pulpa de 12 – 115 mg EAA/100 g; esto refuerza una vez más que, en el epicarpio de *G. mangostana* se encuentra concentrada la mayor cantidad de antioxidantes del fruto.

Determinación antioxidante por el método de ABTS

La actividad evaluada por el método de ABTS mostró que se incrementó durante poscosecha alcanzado un máximo en el día 9 en todas las selecciones (Figura 7). Esto probablemente asociado al incremento de diversas moléculas antioxidantes que se incrementan durante la maduración del Mangostán, como son las xantonas y flavonoides (Gondokesumo *et al*., 2019). En promedio la actividad se mantuvo entre 30 mg EAA/100 g a 75 mg EAA/100 g (Figura 7).

Determinación antioxidante por el método de FRAP

La actividad de FRAP se incrementó en poscosecha y se observó que el día tres presentó la máxima actividad (Figura

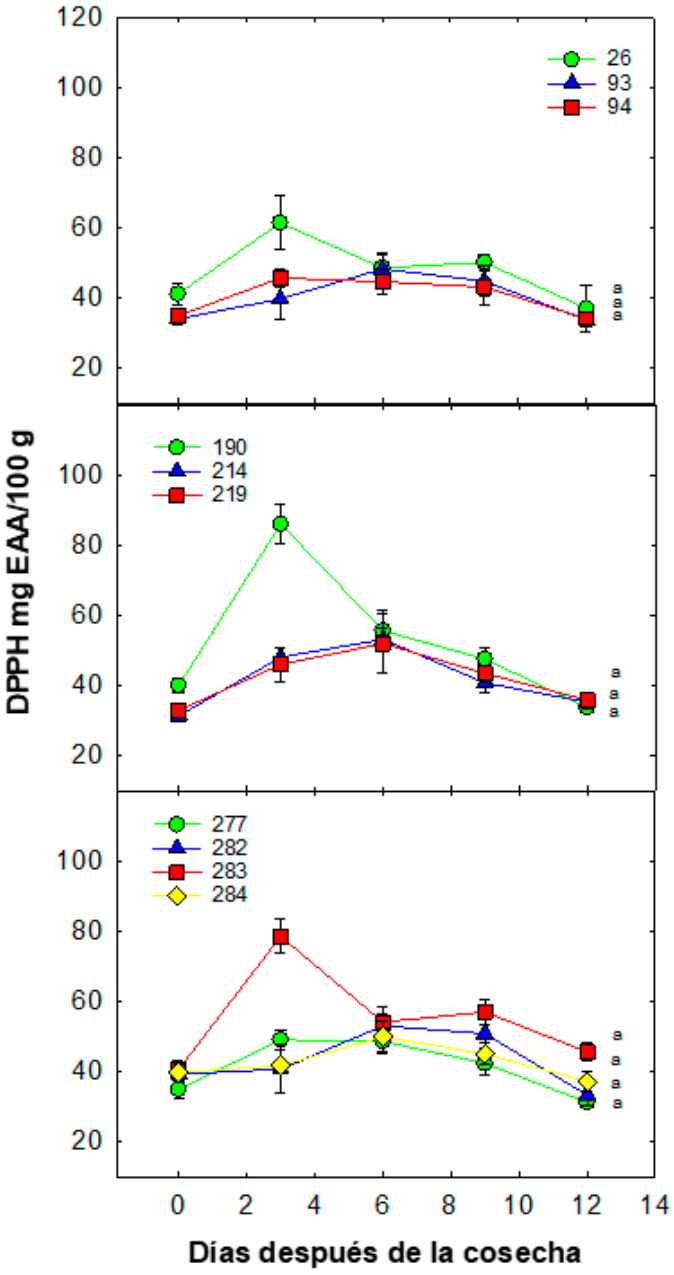


Figura 6. Actividad antioxidante evaluada por DPPH durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05)**;** la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 6. Antioxidant activity evaluated by DPPH during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

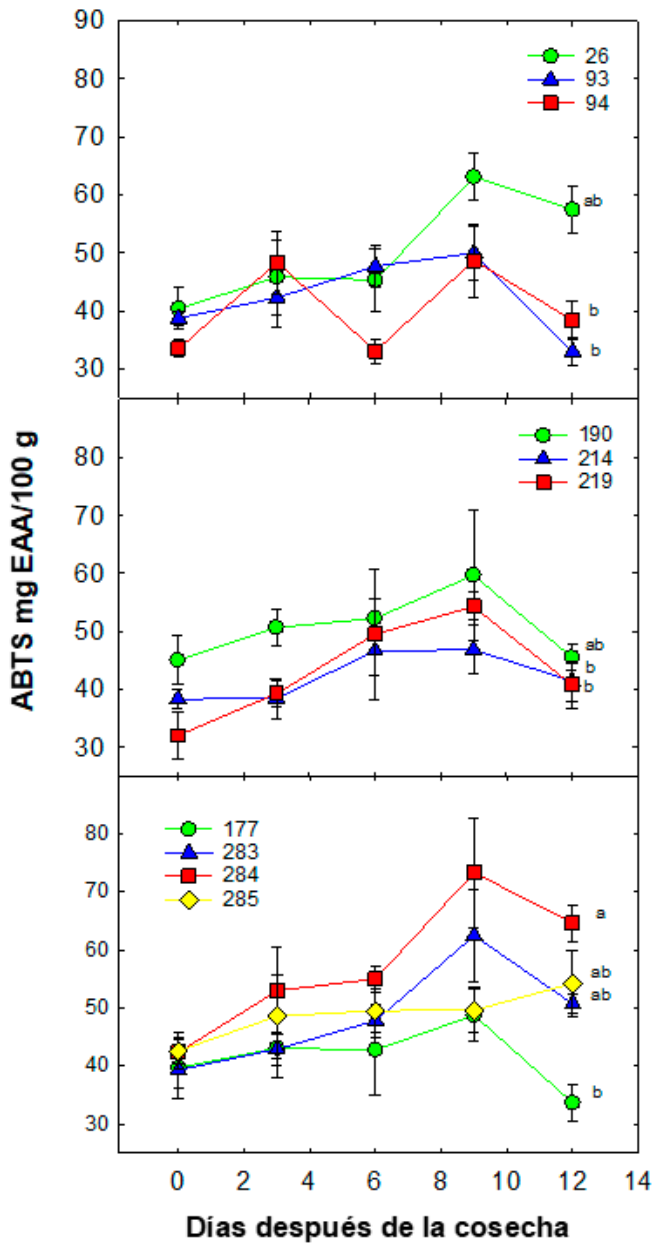


Figura 7. Dinámica de ABTS (mg EAA/100 g) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05); la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 7. ABTS dynamics (mg EAA/100 g) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

8), asociada al comportamiento de compuestos fenólicos en el epicarpio. Los valores que se registraron durante el periodo de evaluación fueron entre 58 mg EAA/100 g y 178 mg EAA/100 g (Figura 8), valores dentro del rango de 40 – 236 mg EAA/100 g reportado por otros autores (Chew y Lim, 2018; Muzykiewicz *et al*., 2020).

La determinación de capacidad antioxidante por el método de FRAP fue donde se registró la mayor actividad antioxidante de la pulpa de *G. mangostana*, los resultados fueron muy superiores en comparación a los métodos de DPPH y ABTS.

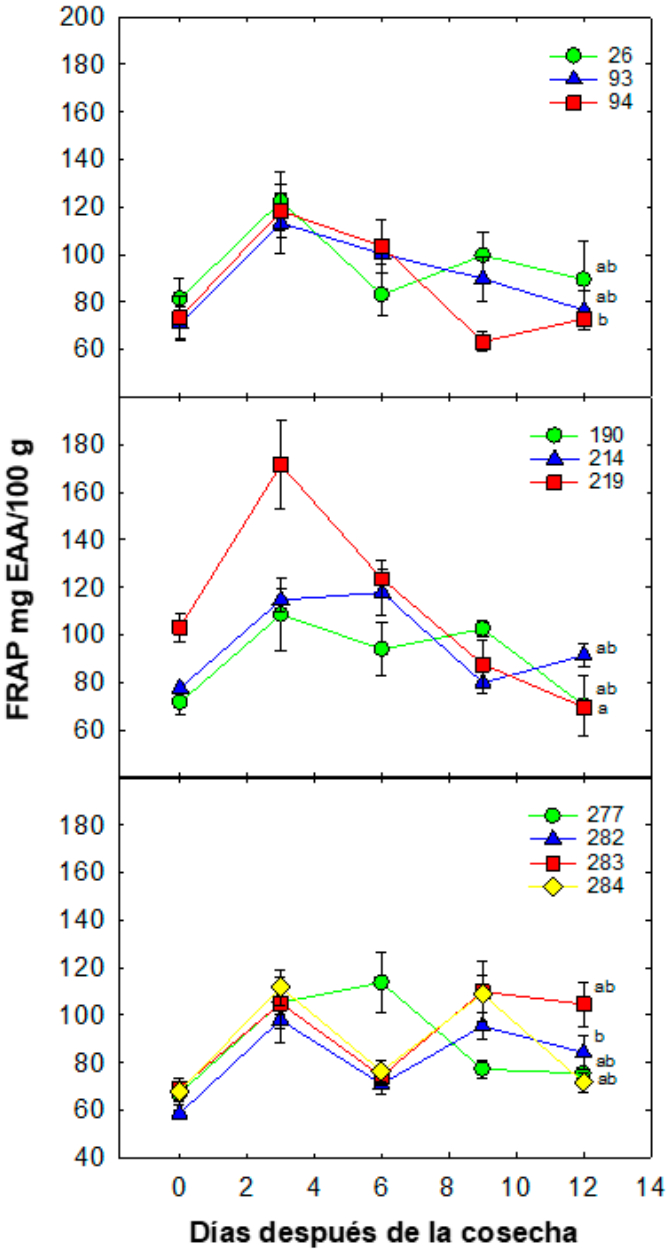


Figura 8. Dinámica de FRAP (mg EAA/100 g) durante la poscosecha de selecciones de mangostán en Tuxtla Chico, Chiapas. Cada punto representa la media de cinco repeticiones y su error estándar. Letras diferentes entre cada ecotipo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (0.05); la simbología expresada por figuras de colores y números representan a las selecciones.

Figure 8. FRAP dynamics (mg EAA/100 g) during postharvest of mangosteen selections in Tuxtla Chico, Chiapas. Each point represents the mean of five repetitions and its standard error. Different letters between each ecotype indicate significant differences according to the Tukey test (0.05); the symbolism expressed by colored figures and numbers represents the selecctions.

CONCLUSIONES

La pulpa de *G. mangostana* cultivada en Tuxtla Chico, Chiapas, demostró tener calidad para su uso en la industria alimenticia y farmacéutica. El contenido de fenoles y la actividad antioxidante del epicarpio indica que puede ser utilizada para diferentes productos en la agroindustria. Los frutos de los árboles 94, 190, 283 y 284 sobresalieron en los análisis por lo que se sugieren para programas de mejoramiento posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONAHCYT por el apoyo a través de la beca nacional de maestría (1200341) otorgada a Alexis Eduardo Martínez Rodríguez y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el aporte de los frutos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Andayani, R., Armin, F. y Mardhiyah, A. 2020. Determination of the total phenolics and antioxidant activity in the rind extracts of *Garcinia mangostana* L. *Garcinia cowa* Roxb., and *Garcinia atroviridis* Griff. EX T. Anders. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 13: 149-152. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i8.36525

A.O.A.C. 1990. Oficial method of analysis. 16th ed. N. Hoorwitz, P. Chialo, & H. Reynold, (Eds.). Association of Official Analiytical Chemistry. Washington, D.C.

Benzie, I.F. y Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239(1): 70-76.

Brand, W.W., Cuvelier, M. y Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss Technology Food Science and Technology. 28(1): 25-30.

Castro, M.F.P.P.M., Anjos, V.D. de A., Rezende, A.C.B., Benato, E.A. y Valentini, S.R. de T. 2012. Postharvest technologies for mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) conservation. Food Science and Technology. 32(4): 668-672. https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000103

Chew, Y.-L. y Lim, Y.-Y. 2018. Evaluation and comparison of antioxidant activity of leaves, pericarps and pulps of three *Garcinia* species in Malaysia. Free Radicals and Antioxidants. 8(2): 130-134. https://doi.org/10.5530/fra.2018.2.19

Daza, R.L.D., Murillo, P.E., Méndez, A.J., Murillo, A.W., Moyano, D.D. y Osorio, N. 2012. Potencial antioxidante de la cáscara del mangostino. Revista Vitae. 19(1): S355-S356.

Díaz, A.M. y Picón, R.L. 2007. Influencia de los factores climáticos en la fenología del mangostán (*Garcinia mangostana* L.) en la zona centro del estado de Veracruz, México. En Memoria del II simposio Internacional de Fruticultura tropical y subtropical. p. 98.

Díaz, F.V.H. y Díaz, H.B.G. 2011. El mangostán (*Garcinia mangostana* L.): Una alternativa para la reconversión productiva en la región tropical húmeda de México. En Tecnologías de producción para el trópico. 65 aniversario del Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. Campo Experimental Rosario Izapa, Libro Técnico No 7. G.G. López, D.J. Iracheta, y A.C.H. Avendaño (ed.), pp. 74-78. INIFAP. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Díaz, F.V.H., Díaz, H.B.G., Ruíz, C.P.A., Mariles, F.V., Cano, G.M.A. y Gálvez, M.L.A. 2011. El mangostán *Garcinia mangostana* L. Libro Técnico No 8. INIFAP. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Díaz Fuentes, V.H., Ruíz-Cruz, P.A., Nájera-Domínguez, W., Iracheta-Donjuán, L. y Gálvez-Marroquín, L.A. 2019. Comportamiento productivo inicial del mangostán (*Garcinia mangostana* L.) en el Soconusco, Chiapas, México. Agro Productividad. 12(3): 17-22. https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1321

FAO. 2022. Major Tropical Fruits Market Review 2021. https://openknowledge.fao.org. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2024.

Gondokesumo, M.E., Pardjianto, B., Sumitro, S.B., Widowati, W. y Handono, K. 2019. Xanthones analysis and antioxidant activity analysis (Applying ESR) of six Ddifferent maturity levels of mangosteen rind extract (*Garcinia mangostana* Linn.). Pharmacognosy Journal. 11(2): 369-373. https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.56

INEGI. 2010. Compendio de información geográfica municipal 2010 Tuxtla Chico Chiapas. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/07102.pdf. Fecha de consulta: 07 de abril de 2024.

John, O.D., Mouatt, P., Panchal, S.K. y Brown, L. 2021. Rind from purple mangosteen (*Garcinia mangostana*) attenuates diet-induced physiological and metabolic changes in obese rats. Nutrients. 13(2): 319. https://doi.org/10.3390/nu13020319

Kanchanapom, K. y Kanchanapom, M. 1998. Mangosteen. En Tropical and Subtropical Fruits. P.E. Shaw, H.T. Chan, y S. Nagi (ed.), pp. 191-216. AgScience Inc.

Ketsa, S. y Paull, R.E. 2011. Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). En Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. E. M. Yahia (ed.), pp. 1-30. Woodhead Publishing.

Larasati, F., Batubara, I. y Lestari, Y. 2020. The presence of endophytic actinobacteria in mangosteen peel (*Garcinia mangostana*) and its antioxidant activity. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 21(4): 1488-1497. https://doi.org/10.13057/biodiv/d210429

Manurakchinakorn, S., Issalakraisila, M. y Nuymak, P. 2008. Physiological and quality attributes of mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) as affected by modified atmosphere packing. Acta Horticulturae. 768: 239-246. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.768.29

Mosquera, M.O.M., Obando, C.M.A. y Ortega, C.N. 2020. Chemistry Characterization and antioxidant activity of mangosteen (*Garcinia mangostana* L., Clusiaceae) cultivated in Colombia. Revista Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas. 19(2): 167-178.

Mulyono, D., Irawati, Y. y Syah, M.J.A. 2021. Identification morphological variability of six mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) As a conservation strategy for local varieties. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 739(1): 012076. https://doi.org/10.1088/1755-1315/739/1/012076

Mustafa, M.A., Ali, A., Seymour, G. y Tucker, G. 2018. Delayed pericarp hardening of cold stored mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) upon pre-treatment with the stress hormones methyl jasmonate and salicylic acid. Scientia Horticulturae. 230: 107-116. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.017

Muzykiewicz, A., Zielonka-Brzezicka, J., Siemak, J. y Klimowicz, A. 2020. Antioxidant activity and polyphenol content in extracts from various parts of fresh and frozen mangosteen [pdf]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 19(3): 261-270. https://doi.org/10.17306/J.AFS.2020.0788

Nardini, M. y Garaguso, I. 2020. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. Food Chemistry. 305: 125437. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437

Nauman, M.C. y Johnson, J.J. 2022. The purple mangosteen (*Garcinia mangostana*): Defining the anticancer potential of selected xanthones. Pharmacological Research. 175: 106032. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106032

Nawawi, N., Ijod, G., Abas, F., Ramli, N., Mohd Adzahan, N. y Mohamad Azman, E. 2023. Influence of different drying methods on anthocyanins composition and antioxidant activities of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarps and LC-MS analysis of the active extract. Foods. 12(12): 2351. https://doi.org/10.3390/foods12122351

Palapol, Y., Ketsa, S., Stevenson, D., Cooney, J.M., Allan, A.C. y Ferguson, I.B. 2009. Colour development and quality of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening and after harvest. Postharvest Biology and Technology. 51(3): 349-353. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.08.003

R. Parijadi, A.A., Ridwani, S., Dwivany, F.M., Putri, S.P. y Fukusaki, E. 2019. A metabolomics-based approach for the evaluation of off-tree ripening conditions and different postharvest treatments in mangosteen (*Garcinia mangostana*). Metabolomics. 15(5): 73. https://doi.org/10.1007/s11306-019-1526-1

Re, R.P.N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, A. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolonization assay. Free Radic Biology and Medicine. 22: 1231-1337.

Rizaldy, D., Hartati, R., Nadhifa, T. y Fidrianny, I. 2022. Chemical compounds and pharmacological activities of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) – Updated review. Biointerface Research in Applied Chemistry. 12(2): 2503-2516. https://doi.org/10.33263/BRIAC122.25032516

Rohman, A., Rafi, M., Alam, G., Muchtaridi, M. y Windarsih, A. 2019. Chemical composition and antioxidant studies of underutilized part of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 9(8): 47-52. https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90807

Sari, N., Katanasaka, Y., Sugiyama, Y., Miyazaki, Y., Sunagawa, Y., Funamoto, M., Shimizu, K., Shimizu, S., Hasegawa, K. y Morimoto, T. 2021. Alpha mangostin derived from *Garcinia magostana* Linn ameliorates cardiomyocyte hypertrophy and fibroblast phenotypes in vitro. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 44(10): 1465-1472. https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00294

Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela R.R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Revista Methods in Enzymology, 299: 152-178.

Sumiasih, I.H., Poerwanto, R. y Efendi, D. 2019. Study of several stages of maturity and storage temperature on color changes and shelf life of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). International Journal of Applied Biology. 3(1): 45-54. https://doi.org/10.20956/ijab.v3i1.5967

Suttirak, W. y Manurakchinakorn, S. 2014. In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract. Journal of Food Science and Technology. 51(12): 3546-3558. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0887-5

Tac-an, A.M.I., Lacap, A.T., Bayogan, E.R.V. y Lubaton, C.D.S. 2021. Postharvest quality of two mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit maturities held in ambient and CoolBot-equipped cold storage. Journal of Science, Engineering and Technology (JSET). 9(1): 48-60. https://doi.org/10.61569/n49qq233

Tiang, N., Ahad, M.A., Murugaiyah, V. y Hassan, Z. 2020. Xanthone-enriched fraction of *Garcinia mangostana* and α-mangostin improve the spatial learning and memory of chronic cerebral hypoperfusion rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 72(11): 1629-1644. https://doi.org/10.1111/jphp.13345

Tongdee, S. C. y Suwanagul, A. 1989. Postharvest mechanical damage in mangosteens. Revista ASEAN Food. 4: 151-155.

Witham, F.H., Blaydes, D.F. y Devlin, R.M. 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, U.S.A.

Wongs-Aree, C. y Noichinda, S. 2022. Postharvest quality properties of potential tropical fruits related to their unique structural characters. En Postharvest Handling Fourth. J.W. Florkowski, H.N. Banks, L.R. Shewfelt, y E.S. Prussia (ed.). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822845-6.00009-9

Yani, F., Belllastasie, R. y Fauziah, F. 2021. Antidiabetic potential of *Garcinia mangostana* extract and α-mangostin compounds from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3(5): 95-105.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Synthesis of acylglycerols structured with n-3 PUFA in a packed bed reactor with recirculation: Op-timization by response surface

Síntesis de acilgliceroles estructurados con AGPI n-3 en un reactor de lecho empacado con recirculación: Optimización por superficie de respuesta

Juan Antonio Noriega Rodríguez[1]*, Cristian Correa-Leyva[1], Esther Carrillo Pérez[1] and Hugo S. García[2]
[1] Universidad de Sonora. Sonora, México.
[2] Instituto Tecnológico de Veracruz. México.

ABSTRACT
The enzymatic esterification of n-3 PUFA and glycerol (G), catalyzed by a *Candida antarctica* lipase, was studied in a recirculating packed-bed reactor for the synthesis of acylglycerols. An n-3 PUFA concentrate was prepared by chemical hydrolysis of Menhaden's oil followed by urea treatment. A rotatable central composite design was used to evaluate the effect of molar ratio (0.47 – 5.52 mol n-3 PUFA / mol G), temperature (28.14 – 71.86°C) and time (0.24 – 2.76 h), on the production structured acylglicerols. The analysis of variance shows that all principal factors have a significant effect ($p < 0.05$). It was determined through response surface methodology that around 80 % of global esterification can be reached, by operating with a molar ratio of 0.5 mol PUFA/mol G, 70°C and 2.75 h. In general, models had a good adjust to experimental data ($R^2 > 0.92$), and the optimal operating conditions for the formation of the different acylglycerols produced during the esterification (monocylglycerols, diacylglycerols and triacyglicerols) can be established.
Keywords: Esterification, n-3 polyunsaturated fatty acids, immobilized lipase, HPTLC, regression models.

RESUMEN
Se estudió la esterificación enzimática de AGPI n-3 y glicerol (G) catalizada por una lipasa de *Candida antarctica* en un reactor de lecho empacado con recirculación para la síntesis de acilgliceroles estructurados. Se preparó un concentrado de AGPI n-3 por hidrólisis química de aceite de Menhaden seguido de un tratamiento con urea. Se utilizó un diseño central compuesto rotable para evaluar el efecto de la relación molar (0.47 – 5.52 mol AGPI n-3 / mol G), la temperatura (28.14 – 71.86 °C) y el tiempo (0.24 – 2.76 h) en la producción de acilgliceroles. El análisis de varianza mostró que todos los factores principales de los modelos presentaron un efecto significativo en las diferentes respuestas ($p < 0.05$). Mediante metodología de superficie de respuesta se determinó que se puede alcanzar una esterificación global cercana a 80 % al operar con una relación molar de 0.5 mol AGPI/mol G, 70 °C y 2.75 h de reacción. En general, los modelos tuvieron un buen ajuste a los datos experimentales ($R^2 > 0.92$) y permiten establecer las condiciones de operación óptimas para la formación de los diferentes acilgliceroles producidos durante la esterificación (monocilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles).

Palabras clave: Esterificación, ácidos grasos poliinsaturados n-3, lipasa inmobilizada, HPTLC, modelos de regresión.

INTRODUCTION
N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), usually present in fish oil, play several important health-related functions and are considered essential because the human body cannot synthesize them (Khan *et al*., 2023, Hernández *et al*., 2016; Baeza *et al*., 2014). Different scientific studies indicate that the consumption of n-3 PUFA reduces the risk for coronary heart disease, neuromuscular diseases, allergies, diabetes, cancer and depression (Kołodziej *et al*., 2023; Shahidi and Ambigaipalan, 2018; Rimm *et al*., 2018; Damasco *et al*., 2018; Hallahan *et al*., 2016; Wang and Huang, 2015; Castellanos and Rodríguez, 2015). The great benefits of n-3 PUFA consumption have motivated the study of the formation of structured acylglycerols (AG) enriched with these fatty acids for nutraceutical and pharmaceutical purposes. Enzymatic processes have multiple advantages over conventional chemical processes, such as operation under mild temperature and pH conditions, reduced energy cost, high catalytic efficiency, and a wide range of fatty acid selectivity of lipases leading to specific and pure products. One method for the production of FAs enriched with n-3 PUFAs is through the direct enzymatic esterification reaction of PUFAs and glycerol (Correa *et al*., 2017). During the stages of the esterification reaction, different products with high added value are produced such as monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG) and triacylglycerols (TAG). MAGs are recognized for being excellent emulsifiers used for food, cosmetic and pharmaceutical applications. The consumption of oils consisting mainly of DAG contributes to weight loss, reduction of body fat, lower liver fat content, improvement of lipid metabolism by favoring oxidation and decreased storage of TAG in the adipose tissue (Nurul Nadiath *et al*., 2020).

The operation in packed bed reactors (PBR) presents multiple advantages compared to batch reactors, for example, it facilitates the contact and separation of the enzyme with the substrates (Zhang *et al*., 2022), allows the reuse of the enzyme, can be operated in continuous mode, and is usually more economical (Lee *et al*., 2016). Furthermore, immobilizing the enzyme provides it with greater catalytic and thermal stability, allowing a longer useful activity time. The immobilized

*Author for correspondence: Juan Antonio Noriega Rodríguez
e-mail: juan.noriega@unison.mx
Received: August 12,2024
Accepted: November 21, 2024
Published: December 17, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2414

lipase from *Candida antarctica* has shown good stability at high temperatures and long operating times (Monteiro *et al*., 2021). The development of a continuous process in an PBR is the most appropriate to carry out reactions catalyzed by lipases involving fats and oils for different industrial applications (Hong, 2014). However, when the substrates injected into the PBR are immiscible, such as n-3 PUFA and glycerol (G), the efficiency of the continuous process decreases considerably. When there is little miscibility in the substrates, an operation mode with recirculation can be chosen for the effective execution of the process (Zhao *et al*., 2012).

Regression analysis using an experimental design, is the construction of predictive models that adequately describe the relationship between the dependent and independent variables of a study process. When the variables of a bioprocess are measurable, continuous and controllable during the experimental runs, a response surface methodology (RSM) study can be carried out considering a rotatable central composite design (RCCD) to determine the effect of the variables and optimize bioprocess responses (Filli *et al*., 2010). RSM is a collection of statistical and mathematical techniques useful for developing, improving and optimizing processes. The most extensive applications are particularly in situations where several input variables influence performance measures or quantity or quality characteristics of a product or a process (Montgomery, 2019).

In the present work, the effect of temperature, molar ratio and time on the direct enzymatic esterification reaction of n-3 PUFA and G, catalyzed by the immobilized lipase of *Candida antarctica* (NV-435) in a PBR with recirculation, was studied by means of a series of experiments based on a RCCD and analyzed using response surface methodology to optimize the production of structured acyglycerols.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Menhaden fish oil (Sigma-Aldrich) and food grade glycerol (J. T. Baker) were used for the reaction medium; tertbutylhydroxyquinone (TBHQ, Química Dresen) as an antioxidant, and dimelsulfoxide (DMSO) as an emulsifier. The NV-435 lipase from *Candida antarctica* (Novo Nordisk Denmark) immobilized in macroporous acrylic resin was used as catalyst. For high-performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis, 10x10 cm plates (Uniplate) were used with analytical grade silica gel, hexane and ethyl ether (Sigma-Aldrich), glacial acetic acid (Fermont) and reagent grade iodine (Fermont).

Isolation and concentration of PUFA

To isolate and concentrate PUFAs from Menhaden oil, the procedure described by Correa *et al*. (2017) was used. One hundred g of oil were weighed and TBHQ (0.02 % w/w) was added as an antioxidant. The mixture was saponified with 200 mL of 7 M KOH in 70 % ethanol by heating at reflux for one hour. A liquid extraction was carried out with distilled water (240 mL) and hexane (200 mL), the aqueous phase was then acidified to pH 1.0 with HCl to subsequently extract the free fatty acids (FFA) with hexane (200 mL). The hexane was removed by evaporation in a rotovapor (40 rpm, 40°C, vacuum 25 mmHg), and the remaining moisture was removed with anhydrous sodium sulfate. In a flask, each 15 g of FFA were mixed with 25 g of urea in 100 mL of 95 % ethanol and heated until the mixture turned a homogeneous yellow color. The solution was transferred to centrifuge tubes and quickly cooled in an ice water bath for subsequent cooling (4°C, 8 h). The crystals formed were separated by centrifugation at 6000x*g* (15 min, 0°C). The supernatant was acidified to pH=4 and transferred to a separatory funnel to extract the PUFA with a 1:1 hexane:water mixture, stirring for 30 min. Finally, the organic phase was evaporated in a rotary evaporator (40 rpm, 40°C, vacuum 25 mmHg) to obtain the PUFA concentrate.

Enzymatic esterification in PBR with recirculation

The experimental runs to study the enzymatic esterification reaction were carried out based on a RCCD. Mixtures of 5 g with different molar proportions of n-3 PUFA and G (0.48, 1.5, 3, 4.5, 5.52 mol/mol), TBHQ (0.02 % w/ p) as antioxidant, and DMSO (1 % w/w) as emulsifier, were prepared in glass vials (20 mL) with magnetic stirrer. Each vial was placed inside a double arm cooling jacket reactor (Wheaton Celstir®) placed on a magnetic stirring plate at 800 rpm. After stirring the mixture for 30 minutes, a peristaltic pump was used to recirculate the medium at a flow rate of 1.65 mL/min through an PBR (length = 5.104 cm and diameter = 0.717 cm) with 0.9115 g of immobilized lipase NV- 435 of *Candida antarctica*. A water recirculator bath was used to maintain an isothermal process, experimental runs were carried out at different operating temperatures (28.14, 37, 50, 63, 71.86 °C) and 35 µL samples were taken at different reaction times (t = 0.24 , 0.75, 1.5, 2.25, 2.76 h). A representative diagram of the process is shown in Figure 1.

Analysis of acylglycerols (AG) and global esterification

The analysis was carried out in a HPTLC equipment (CAMAG). Aliquots (5 µL) of the sample were diluted in a chloroform:methanol solution (2:1 v/v) to obtain a final concentration of 20 µg AG/ µL sample. One microliter of each diluted sample was applied on a silica gel plate 1 cm from the edge and with a separation of 1 cm between each sample. The plate was saturated with the mobile phase of hexane:ethyl ether (38:62 v/v) with 1 % glacial acetic acid in a vertical double-channel glass chamber for thin layer chromatography by 40 minutes. The plate was placed into the mobile phase for chromatographic development until a path of 9 cm was reached. The plate was then removed from the chamber and the solvent was evaporated into the air. The plate was developed by atomizing a solution of iodine in ethanol (0.5 % w/v), until achieving a light yellow color on the surface of the plate and the solvent was cold evaporated for 30 min. The developed plate was scanned, and shadow area analysis of the spot bands was performed using ImageJ 1.45 software

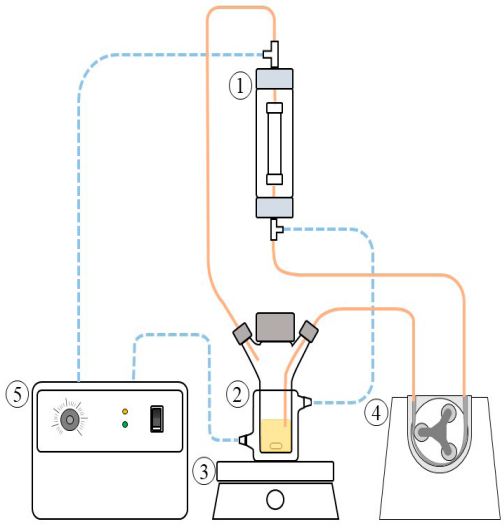


Figure 1. Operation diagram of the enzymatic esterification reaction in the packed bead reactor (PBR) with recirculation. 1: jacketed PBR, 2: jacketed double sidearm Celstir®, 3: magnetic stirrer, 4: peristaltic pump and 5: recirculator water bath with temperature control.
Figura 1. Diagrama de operación de la reacción de esterificación enzimática en el reactor de lecho empacado (RLE) con recirculación. 1: RLE enchaquetado, 2 Celstir ® de doble brazo enchaquetado, 3: agitador magnético, 4: bomba peristáltica y 5: baño recirculador de agua con control de temperatura.

(NIH; Rasband, 2018). For the quantification of MAG, DAG and TAG, a standard curve was generated using lipid standards (Sigma-Aldrich) containing a mixture of *cis*-9-monoolein, *cis*-9-1,2-diolein, *cis*-9-1,3-diolein and *cis*-9-triolein.

The G concentration was calculated using a stoichiometric mass balance considering the concentrations of MAG, DAG and TAG, determined by HPTLC analysis using the following equation:

$$C_G = Co_G - (C_{MAG} + C_{DAG} + C_{TAG}) \quad (1)$$

To determine the global esterification (GE), 30 µL aliquots were taken and diluted in ethanol. The samples were titrated with a 0.05 N NaOH solution using phenolphthalein as an indicator.

Experimental design and statistic analysis

A RCCD was selected to evaluate the effect of the molar ratio between PUFA and G (x_1=*M*), temperature (x_2=*T*) and time (x_3=*t*), on GE (y_1), MAG (y_2); DAG (y_3) and TAG (y_4) production.

To predict the dependent variables (y_i) a third order polynomial regression model was considered:

$$y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k} \beta_{iii} x_i^3 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{i<j}^{k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Where β_0, β_i, β_{ii}, β_{iii}, and β_{ij} represent the interaction coefficients in the regression, the linear effect, quadratic effect, cubic effect and the combined effects, respectively.

A simplified model was considered for each response according to the significative variables (α = 0.05) resulted from the analysis of variance. Statistical analysis was performed in a JMPpro v17.0 ® platform.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 records the experimental results of the enzymatic esterification of n-3 PUFA and G from the different experimental runs established for the RCCD. The coefficient of determination (R^2) is a value that varies from 0 to 1 that expresses the prediction of a model to the experimental data, with a value close to 1 indicating a better prediction, however, in these models the value of R_{adj}^2 is usually considered, which is a corrected measure of goodness of fit to determine the precision of the model that identifies the percentage of variance in the target field that is explained by the model inputs. Gutierrez and De la Vara (2012) suggest that an R^2 greater than 0.75 is adequate to determine a good fit of the model to the experimental data. In this study, R^2 greater than 0.92 and R_{adj}^2 values greater than 0.74 were obtained. Different bioprocess investigations have obtained R^2 values similar to those reported in this study (Pereira *et al*., 2018). The statistical analysis showed that the models had a significant effect with respect to the different responses ($p < 0.05$).

The F statistic was performed in the ANOVA, high F values were obtained, higher than the critical values, which indicate that the models are statistically significant (Nahemiah *et al*., 2015). The results of the statistical analysis of the models are recorded in Table 2. To determine the fit model for each of the responses, the least significant parameters ($p > 0.2$) were eliminated to optimize the value of R_{adj}^2.

Global esterification (GE)

The parameters with the greatest effect on the GE are the linear and quadratic terms of the molar ratio and reaction time ($p < 0.005$). In the analysis of variance, the effect of temperature did not have a representative effect on GE ($p = 0.3954$), but it was included in the equation to have a hierarchical model because the interaction term between temperature and time had a significant effect ($p < 0.1$). The model to describe the GE obtained through second-order polynomial regression is the following:

$$GE = 3.019\,M^2 - 6.157\,t^2 - 2.647\,M\,t + 0.223\,T\,t - 15.369\,M + 21.593\,t - 0.180\,T + 48.124 \quad (3)$$

The RSM graphs show that a GE close to 80 % can be achieved by operating with a molar ratio of 0.5 mol PUFA/mol G and a temperature of 70°C for 3 h (Fig. 2a). It is important to clarify that by decreasing the molar ratio (M), n-3 PUFAs have more binding sites in the G structure due to the surplus of this substrate considering that the stoichiometric ratio is 3:1 mol PUFA/mol G, therefore, it is normal to obtain higher degrees of esterification. Linder *et al*. (2005) studied the enzymatic esterification reaction of PUFA and G in a batch reactor, and obtained a higher GE at a molar ratio of 0.83 mol PUFA/mol G at 46°C. It is important to highlight the high reaction rate that occurs in the PBR, since a high GE was

Table 1. Experimental and predicted results of the enzymatic esterification of n-3 PUFAs and G in the PBR with recirculation.
Tabla 1. Resultados experimentales y predichos de la esterificación enzimática de los AGPI n-3 y G en el RLE con recirculación.

Run	Factors			GE%		MAG%*		DAG%*		TAG%*	
	M	***T***	***t***	exp	pred	exp	Pred	exp	pred	exp	pred
1	1.5	37	0.75	43.76	40.48	56.87	56.61	28.13	28.28	15.00	14.22
2	1.5	37	2.25	50.16	52.79	59.86	61.39	22.00	24.00	18.14	17.08
3	1.5	63	0.75	59.64	42.86	59.42	59.76	26.91	26.03	13.67	13.86
4	1.5	63	2.25	61.44	59.93	53.41	52.88	26.88	26.68	19.71	20.18
5	4.5	37	0.75	42.17	41.91	40.68	43.40	28.89	28.45	30.43	29.47
6	4.5	37	2.25	42.17	43.33	48.04	48.18	27.53	27.77	24.43	23.56
7	4.5	63	0.75	46.49	44.28	53.14	53.80	26.64	26.20	20.22	20.59
8	4.5	63	2.25	49.70	50.46	46.16	46.91	29.04	30.45	24.80	25.08
9	0.47	50	1.5	65.29	66.25	50.99	65.62	26.61	26.19	22.40	22.81
10	5.52	50	1.5	33.12	59.49	51.38	49.49	29.72	29.50	18.89	19.31
11	3	28.14	1.5	42.75	39.61	55.20	53.39	28.62	27.69	16.18	18.07
12	3	71.86	1.5	47.10	47.61	55.05	54.97	27.77	28.05	17.18	16.12
13	3	50	0.24	23.09	26.18	47.45	46.50	26.30	27.48	26.25	26.67
14	3	50	2.76	43.86	41.73	50.79	44.73	29.28	27.45	19.93	20.34
15	3	50	1.5	44.44	43.61	52.72	45.62	22.82	35.89	24.46	21.37
16	3	50	1.5	38.88	43.61	43.55	45.62	36.00	35.89	20.45	21.37
17	3	50	1.5	44.19	43.61	45.00	45.62	35.68	35.89	19.33	21.37
18	3	50	1.5	43.50	43.61	48.93	45.62	25.26	35.89	25.81	21.37

M= molar ratio (mol PUFA / mol G), T= Temperature (°C), t= time (h), GE = Global esterification (%), MAG % = Monoacylglycerols (% mol), DAG % = Diacylglycerols (% mol), TAG % = Triacylglycerols (% mol).
* The percentage molar fraction was calculated based on the total fatty acids.

Table 2. Statistical terms obtained in the statistical analysis of the GE, MAG %, DAG % and TAG % models.
Tabla 2. Términos estadísticos obtenidos en el análisis estadístico de los modelos de GE, % MAG, % DAG y % TAG.

Statistic	GE	MAG%*	DAG%*	TAG%*
R^2	0.946	0.927	0.922	0.921
R^2_{adj}	0.899	0.854	0.834	0.747
F value	23.913	12.740	10.467	5.301
P value	<0.0001	0.0017	0.0028	0.0392

GE = Global esterification (%), MAG % = Monoacylglycerols (% mol), DAG % = Diacylglycerols (% mol), TAG % = Triacylglycerols (% mol).
* The percentage molar fraction was calculated based on the total fatty acids.

obtained at relatively short operating times, unlike different studies in intermittent reactors where long reaction times are required to achieve a significant GE (Noriega *et al*., 2013; Wang *et al*., 2011). The RSM of temperature versus molar ratio provides very interesting information (Fig. 2b). Firstly, the model suggests that at higher molar ratios (M > 4) the GE can increase a little, however, it is not advisable to operate under these conditions because PUFA are the limiting reagent in esterification, and these are the most expensive substrate of the process due to its laborious obtaining process (Torres *et al*., 2014). Secondly, it can be seen that temperature is not as significant a variable in the GE as time and molar ratio, obtaining similar GE at different operating temperatures in relation to the proportions of the substrates in the medium. Correa *et al*. (in press) studied the kinetics of enzymatic esterification of n-3 PUFA and G at different temperatures in a batch reactor, and it was observed that an increase in temperature raised the GE reached during the reaction relatively little.

Synthesis of monoacylglycerols

MAGs are the first product formed in the enzymatic esterification reaction, and as the reaction proceeds, the formation of DAG consumes the MAGs present in the reaction medium. The parameters with the greatest effect on the percentage molar fraction of MAG (% MAG) are the linear term of the molar ratio, and the quadratic terms of the molar ratio and temperature ($p < 0.005$). The statistical model that describes the MAG % is:

$$MAG\,\% = 1.876\,M^2 + 0.018\,T^2 + 0.093\,M\,T - 0.299\,T\,t - 19.099\,M - 1.585\,T + 14.251\,t + 107.631 \quad (4)$$

Figure 3 shows the RSM graphs of the MAG %. The model suggests that the MAG % can be optimized, reaching 80 %, by operating with a molar ratio of 0.5 mol PUFA/mol G and 30°C for 2.75 h. Byun *et al*. (2007) studied the formation of MAG in the enzymatic esterification of fish oil, and determined that, at low operating temperatures, greater MAG formation occurs. Similarly, Zhao *et al*. (2011) sought to optimize the formation of MAG in an enzymatic esterification reaction without solvents, and obtained conversions of 49.6 % at a molar ratio of 0.16 mol AGL/mol G and a temperature of 50°C. Figure 3b shows the response surface of the molar ratio against temperature (t = 0.5 h), observing that operating with higher molar ratios can slightly increase the MAG %, this result is similar to that obtained by Noriega *et al*. (2013), in which the enzymatic esterification reaction of n-3 PUFA and G was studied in an intermittent reactor.

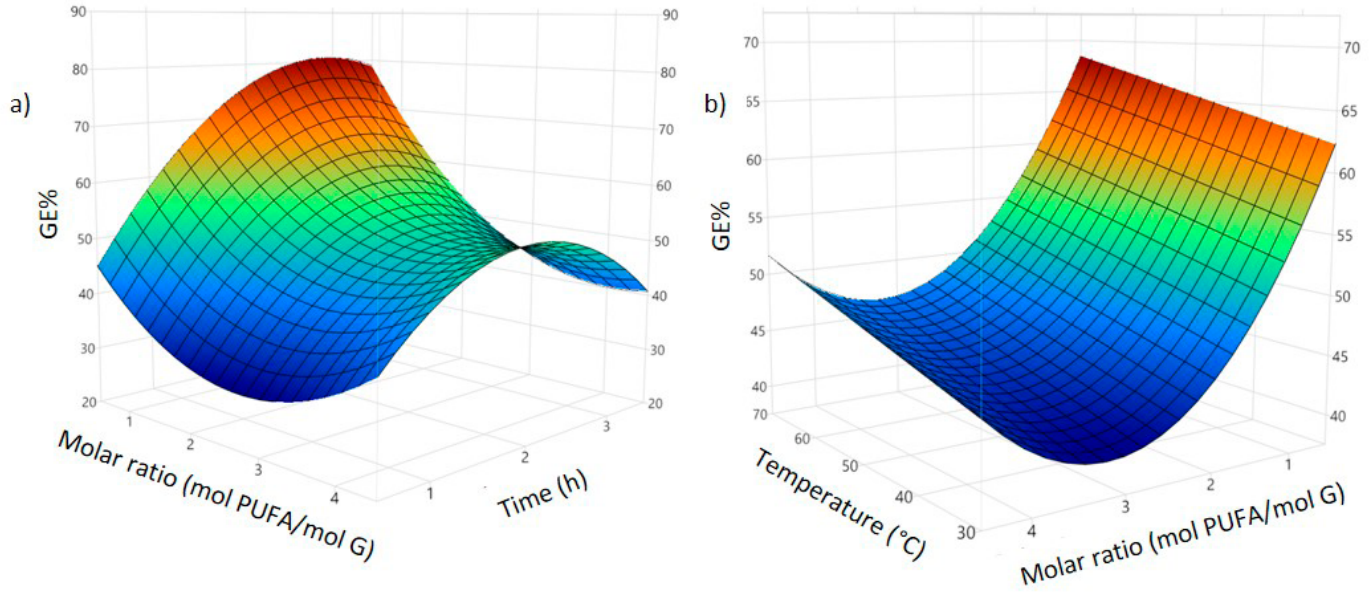


Figure 2. Response surface for global esterification (GE) in the PBR with recirculation. a) versus molar ratio and time at T=70°C, b) versus temperature and molar ratio at t = 1.5 h.
Figura 2. Superficie de respuesta para la esterificación global (EG) en el RLE con recirculación. a) contra la relación molar y el tiempo a T=70°C, b) contra la temperatura y la relación molar a t = 1.5 h.

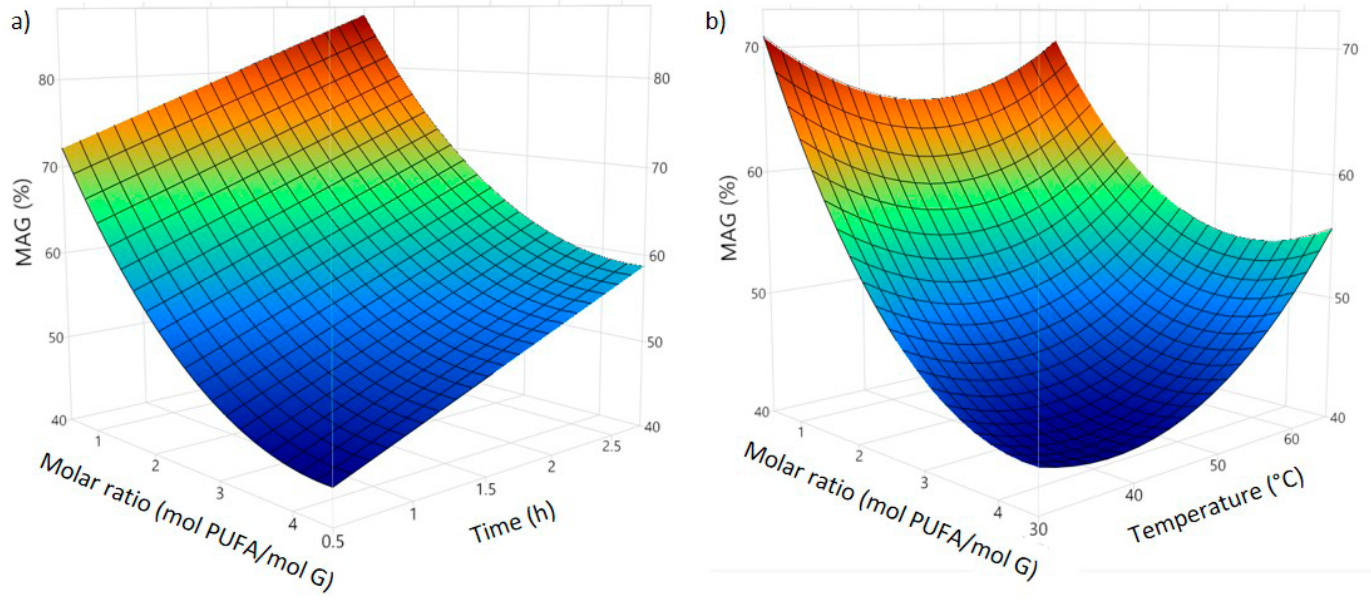


Figure 3. Response surface for monoacylglyerols (MAG) in the PBR with recirculation. a) versus molar ratio and time at T = 28°C, b) versus temperature and molar ratio at t = 0.5 h.
Figura 3. Superficie de respuesta para los monoacilgliceroles (MAG) en el RLE con recirculación. a) contra la relación molar y el tiempo a T = 28°C, b) contra la temperatura y la relación molar a t = 0.5 h.

Synthesis of diacylglycerols

DAGs are an intermediate product in the enzymatic esterification reaction, however, these are lipids with high added value due to their multiple benefits. The parameters with the greatest effect in the model are the quadratic effects of time, molar ratio and temperature, presenting values $p < 0.001$. The model that determines the percentage mole fraction of DAG (% DAG) is the following:

$$DAG\,\% = -1.265\,M^2 - 0.016\,T^2 - 5.297\,t^2 + 0.799\,M\,t + 0.126\,T\,t + 7.045\,M + 1.497\,T + 7.166\,t - 18.672 \quad (5)$$

The RSM analysis performed on temperature versus time (Fig. 4a) shows that at a temperature of 50.33°C, molar ratio of 3.26 mol PUFA/mol G and reaction time of 1.52 h, the production of DAG can be maximized in the enzymatic esterification reaction (DAG %=36). This behavior is due to the fact that, in the reaction mechanism, at one of the first stages

of esterification, the MAG react with PUFA to form DAG, but in the next stage these are consumed for the formation of TAG. Different investigations have published kinetic profiles of DAG formation similar to those obtained in this investigation (Correa *et al*., 2017; Bornadel *et al*., 2013). Duan *et al*. (2010) sought to optimize the formation of 1,3-DAG from an enzymatic esterification reaction in a batch reactor. They obtained optimal formation conditions at 60°C and a molar ratio of 2.5 mol FFA/ mol G, reaching a concentration of 40 %. Lo *et al*. (2007) studied the enzymatic esterification of palmitic and oleic acid catalyzed by the lipozyme lipase RM IM, obtaining optimal conditions for the formation of DAG at 66.29°C, operating with a molar ratio of 2.14 mol FFA/mol G. Although the results obtained differ slightly from those reported by other researchers, the enzymatic esterification reaction presents many factors that can influence the performance and behavior of the process, such as the composition of the substrate (Rivero *et al*., 2020; Kahveci and Xu, 2011), the lipase used and the water present in the reaction medium.

Synthesis of triacylglycerols

Due to the low goodness of fit of a second-order polynomial model (R^2=0.74) to describe the percentage mole fraction of TAG, it was decided to consider a third-order model that included the combined effect of all factors and their respective cubic terms. The terms with the greatest effect in the model are the quadratic and cubic terms of the molar ratio ($p < 0.01$). The equation that describes the % TAG is:

$$\%\,TAG = -0.844\,M^3 - 3.695\,t^3 + 0.059\,M\,T\,t + 7.550\,M^2 - 0.009\,T^2 + 17.97\,t^2 - 0.153\,M\,T - 4.139\,M\,t - 8.384\,M + 1.042\,T - 22.073\,t + 5.029 \quad (6)$$

TAGs are the products generated at the last stage of the enzymatic esterification reaction; this is reflected in their low concentration obtained in the experimental results due to the reversibilities present during the reaction. The model obtained through RSM indicates that higher molar fractions of TAG are obtained by increasing the reaction time and with n molar ratio of approximately 4.5 mol PUFA/mol G, reaching a molar fraction close to 26 % (Fig. 5a). The low TAG conversions achieved in the experimental runs may also be due to the reversible effects caused by the water produced during the esterification reaction, for this reason, many investigations seek to eliminate or isolate the water present in the medium to optimize the process and obtain better performances in the formation of TAG (Rodrigues and Fernandez, 2010). Noriega *et al*. (2013)-studied the yield of TAG formation in the enzymatic esterification of PUFA catalyzed by the NV-435 lipase. After a 24 h reaction they only reached yields close to 12 %, so they added molecular meshes in order to isolate the water in the reaction medium and after another 24 h they achieved yields close to 80 %; this implies that the water caused strong reversible effects in the formation of TAG. The MSR graph of temperature versus molar ratio (Fig. 5b), at t=1.5 h, reflects that higher TAG conversions can be obtained at temperatures close to 50°C.

It is recommended that the model obtained be considered only within the operating range established in the experimental design because, although a good fit (R^2=0.92) is observed, certain inconsistencies occur when extrapolating the study range. Studying a process through an experimental design is very effective to contemplate the effect of factors

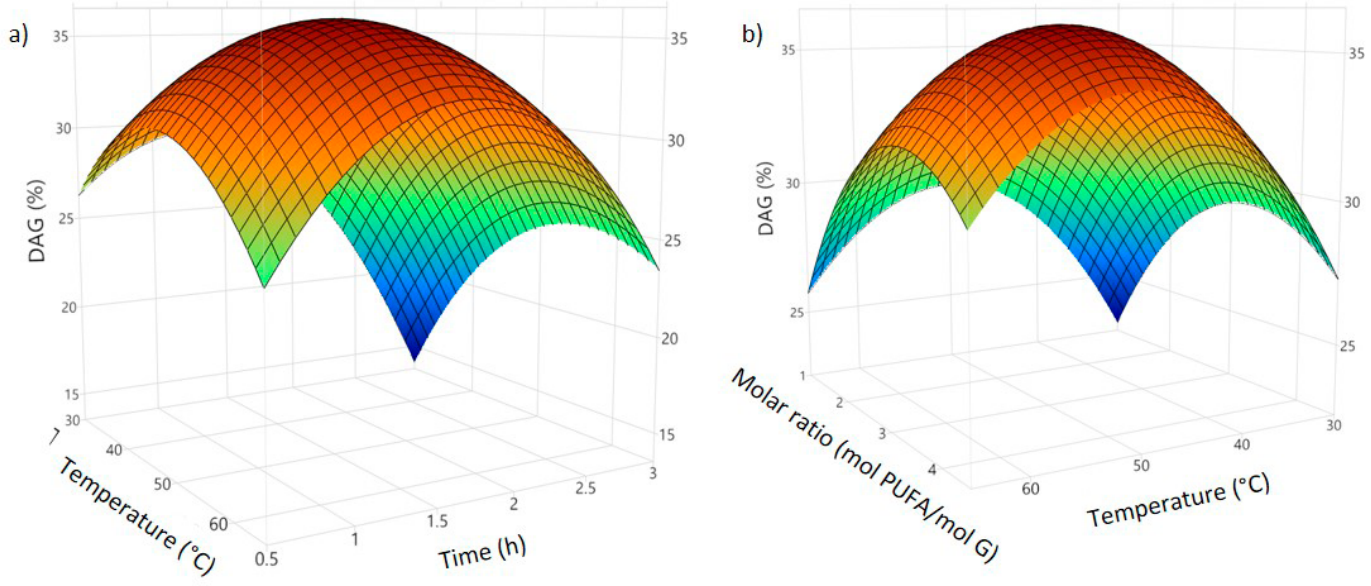


Figure 4. Response surface for diacylglycerols (DAG) in the PBR with recirculation. a) versus temperature and time at molar ratio =3.26, b) versus temperature and molar ratio at t=1.5 h.

Figura 4. Superficie de respuesta para diacigliceroles (DAG) en el RLE con recirculación. a) contra la temperatura y el tiempo a una relación molar =3.26, b) contra la temperatura y la relación molar a un t=1.5 h.

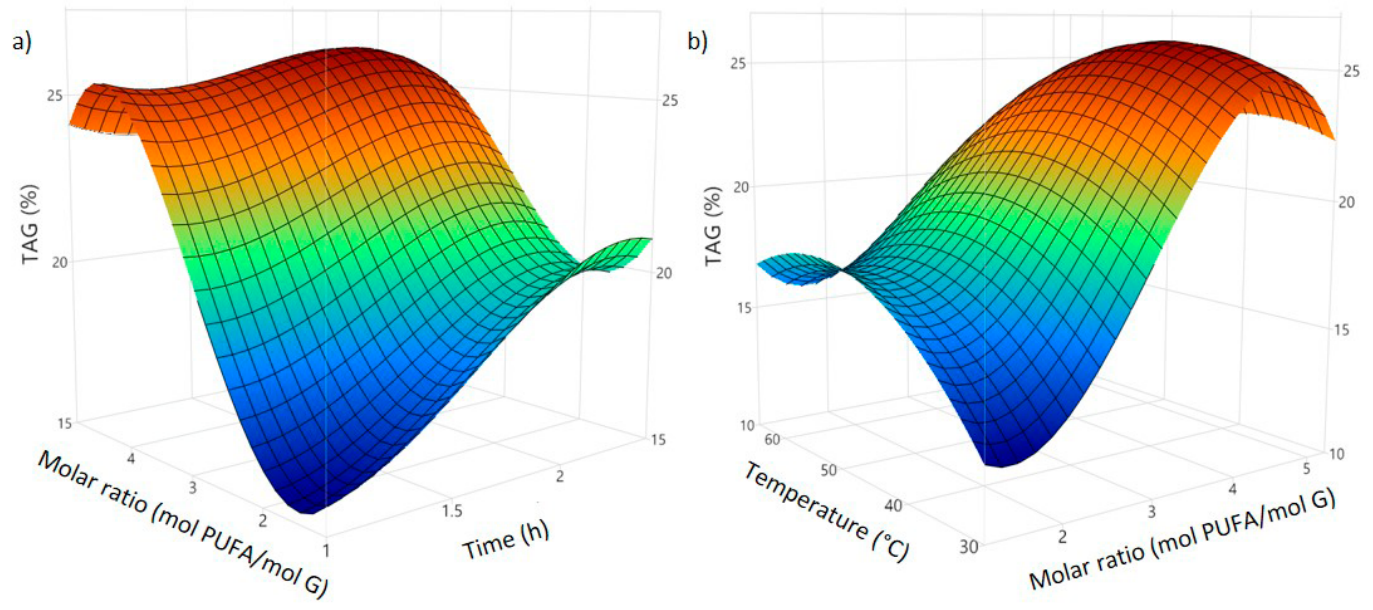


Figure 5. Response surface for triacylglycerols (TAG) in the PBR with recirculation. a) versus molar ratio and time at T = 50°C, b) versus temperature and molar ratio at t = 1.5 h.
Figura 5. Superficie de respuesta de triacilgliceroles (TAG) en el RLE con recirculación. a) contra la relación molar y el tiempo a T = 50°C, b) contra la temperatura y la relación molar a t = 1.5 h.

on the responses analyzed, but the models are usually limited to values established at the treatment levels (Montgomery, 2019).

CONCLUSIONS

The operation of the PBR with recirculation presented multiple benefits compared to an intermittent reactor, such as high degrees of esterification at relatively short operating times, the possibility of reusing the immobilized lipase which, throughout the experiments, did not present apparent activity loss and in addition, resulted in an easy products separation. The experimental design considered to evaluate the effect of the ratio of substrates, temperature and operation time on the synthesis of structured acyglycerols allows the optimization of reaction conditions depending on the desired product. The analysis of variance showed that the main factors of the models presented a significant effect on the different responses ($p < 0.05$), and the established models had a good fit to the experimental data ($R^2 > 0.92$). With RSM, it was determined that a GE close to 80 % can be achieved when operating with a molar ratio of 0.5 mol PUFA/mol G, 70°C and 2.75 h of reaction. To maximize the production of MAG, it is recommended to operate with a molar ratio of 0.5 mol PUFA/mol G and 30°C, for 2.5 h of reaction, obtaining 80 % mol MAG. The maximum formation of DAG, close to 36 mol %, is reached with a ratio of 3.26 mol PUFA/mol G, 50.3 °C and 1.5 h of reaction. As for TAG, a molar fraction of 26 % was achieved when operating with a ratio of 4.5 mol PUFA/mol G, 50 °C and 2 h of reaction. The water produced during the reaction caused considerable reversible effects during the reaction, which may favor the production of MAG, but impair the formation of TAG. This study can be considered as a reference for the design and scaling of similar bioprocesses.

Abbreviations

AG	Acylglycerol
ANOVA	Analysis of variance
DAG %	Percent molar fraction of diacylglycerols
DAG	Diacylglycerol
FFA	Free fatty acids
GE	Global esterification
G	Glycerol
MAG %	Percent molar fraction of monocylglycerols
MAG	Monoacylglycerol
PBR	Packed bed reactor
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RCCD	Rotatable central composite design
RSM	Response surface methodology
TAG %	Percent molar fraction of triacylglycerols
TAG	Triacylglycerol

Acknowledgments

Author Correa-Leyva gratefully acknowledges financial support for his PhD studies (scholarship 590674) from CONAHCYT (Mexico).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Baeza, R., López, L.X. and García, H.S. 2014. Biocatalytic modification of food lipids: reactions and applications. Revista Mexicana de Ingeniería Química 13 (1), 29-47. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62031166003

Bornadel, A., Orellana, A.C., Adlercreutz, P. and Hatti K.R. 2013. Kinetic modeling of lipase-catalyzed esterification reaction between aleic acid and trimethylolpropane: a simplified model for multi-substrate multi-product ping–pong mechanisms. Biotechnology Progress 29, 1422-1429. https://doi.org/10.1002/btpr.1806

Castejón Natalia & Francisco Javier Señoráns. (2021). Integrated green and enzymatic process to produce omega-3 acylglycerols from *Echium plantagineum* using immobilized lipases. J Am Oil Chem Soc 98: 341–352. DOI 10.1002/aocs.12464.

Castellanos, T.L. and Rodríguez, D.M. 2015. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. Revista Chilena de Nutrición 42 (1), 90-95. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000100012

Correa, C., Tejeda, A., Martin, A.R., García, H.S. and Rodríguez, J.A. 2017. Cinética de esterificación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados n-3 a glicerol: Mecanismo ping-pong multi-sustrato multi-producto. Revista Mexicana de Ingeniería Química 16 (3), 805-812. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62053304010

Damasco, E., Ventura, J.L., Guevara, M. and Zentella, A. 2018. Omega-3 polyunsaturated fatty acids supplemented diet and its preventive effect on tumor growth in nude mice. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria 38 (2), 16-21. DOI: 10.12873/382damasco

Duan, Z.Q., Du, W. and Liu, D.H. 2010. Novozym 435-catalyzed 1, 3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. Process Biochemistry 45 (12), 1923-1927. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.007

Filli, K.B., Nkama, I., Abubakar, U.M. and Jideani, V.A. 2010. Influence of extrusion variables on some functional properties of extruded millet-soybean for the manufacture of 'fura': A Nigerian traditional food. African Journal of Food Science 4 (6), 342- 352. Recuperado de: bit.ly/3dgjrV6

Gutierrez Pulido, H., and De la Vara, S.R. 2012. Análisis y Diseño de Experimentos. 3er Edición. Ed. Mc Graw Hill. México.

Hallahan, B., Ryan, T., Hibbeln, J.R., Murray, I.T., Glynn, S., Ramsden, C.E., SanGiovanni, J.P. and Davis, J.M. 2016. Efficacy of omega-3 highly unsaturated fatty acids in the treatment of depression. The British Journal of Psychiatry 209 (3), 192-201. https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.160242[

Hernández Rodas, M.C., Morales, P.J., Valenzuela, B.R., Morales, I.G. and Valenzuela, B.A. 2016. Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 en la enfermedad por hígado graso no alcohólico. Revista Chilena de Nutrición 43 (2), 196-205. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000200013

Hong, S.I., Ma, N., No, D.S., Choi, N., Baik, J.Y., Kim, C.T., Kim, Y., Chang, E. and Kim, I.H. 2014. Enrichment of DHA from tuna oil in a packed bed reactor via lipase-catalyzed esterification. Journal of the American Oil Chemists' Society 91 (11), 1877-1884. DOI 10.1007/s11746-014-2536-9

Kahveci, D. and Xu, X. 2011. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. Food Chemistry 129 (4), 1552-1558. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.142

Khan, I., Hussain, M., Jiang, B., Zheng, L., Pan, Y., Hu, J., Khan, A., Ashraf, A. and Zou, X. 2023. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids: Metabolism and health implications. Progress in Lipid Research, 101255. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101255

Kołodziej, Ł., Czarny, P.L., Ziółkowska, S., Białek, K., Szemraj, J., Gałecki, P., Su, K.P. and Śliwiński, T. 2023. How fish consumption prevents the development of major depressive disorder? A comprehensive review of the interplay between n-3 PUFAs, LTP and BDNF. Progress in Lipid Research, 101254. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101254

Lee, E.J., Lee, M.W., Kim, H.J., Oh, S.W., Kim, Y. and Kim, I.H. 2016. Preparation of high purity docosahexaenoic acid from microalgae oil in a packed bed reactor via two-step lipase-catalysed esterification. Journal of Functional Foods 21, 330-337. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.020

Montgomery, D. C. 2019. Response surface methods and designs. In Design and Analysis of Experiments, 10th ed. John Wiley & Sons.

Nahemiah, D., Nkama, I. and Badau, M.H. 2015. Application of response surface methodology (RSM) and central composite design (CCD) to optimize minerals composition of rice-cowpea composite blends during extrusion cooking. Int J Food Sci Nutr Eng 5, 40-52. DOI: 10.5923/j.food.20150501.06

Noriega Rodríguez, J.A., Carrillo Pérez, E., Gámez Meza, N., Medina Juárez, L.A., Baeza Jiménez, R. y García, H. S. 2013. Optimization of the lipase catalyzed production of structured acylglycerols with polyunsaturated fatty acids isolated from sardine oil. Journal of Food Research 2 (6), 97-105. http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v2n6p97

Nurul Nadiah Abd Razak, Yolande Pérès, Lai Ti Gew, Patrick Cognet, and Mohamed Kheireddine Aroua. 2020. Effect of reaction medium mixture on the lipase catalyzed synthesis of diacylglycerol. Industrial & Engineering Chemistry Research 59 (21), 9869-9881. DOI: 10.1021/acs.iecr.0c00298

Pereira, G.N., Holz, J.P., Giovannini, P.P., Oliveira, J.V., de Oliveira, D. and Lerin, L.A. 2018. Enzymatic esterification for the synthesis of butyl stearate and ethyl stearate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 16, 373-377. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.008

Piñeiro, G., Lago, N. y Culebras, J.M. 2013. Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Revisión. Nutrición Hospitalaria 28, 1-5. http://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6312

Rasband, W.S. 1997-2018. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/.

Rimm, E.B., Appel, L.J., Chiuve, S.E., Djoussé, L., Engler, M.B., Kris-Etherton, P.M., Mozaffarian, D., Siscovick, D. and Lichtenstein, A.H. 2018. Seafood long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association. Circulation, 138 (1), e35-e47. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000574

Rivero, F., Padial, M., Guadix, E.M. and Morales, R. 2020. Novozyme 435 and lipozyme RM IM preferably esterify polyunsaturated fatty acids at the sn-2 position. European Journal of Lipid Science and Technology 122 (10), 2000115. https://doi.org/10.1002/ejlt.202000115

Monteiro, R.R.C., Virgen-Ortiz, J.J., Berenguer-Murcia, A., da Rocha, T.N., dos Santos, J.C.S., Alcántara, A.R. and Fernandez-Lafuente, R. 2021. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. Catalysis Today, 362,141-154.

Rodrigues, R.C. and Fernandez, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66 (1-2), 15-32. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008

Shahidi F. and Ambigaipalan P. 2018. Omega-3 Polyunsaturated fatty acids and their health benefits. Annual Review of Food Science and Technology 9, 345-81. https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850

Torres, P., Pedrali, A., Bavaro, T., Ambrosini, S., Marrubini, G., Pappalardo, V.M., Massolini, G., Terreni, M. and Ubiali, D. 2014. Preparation of PUFA concentrates as acylglycerols via enzymatic hydrolysis of hempseed oil (*Cannabis sativa* L.) in a homogeneous low-water medium. European Journal of Lipid Science and Technology 116 (11), 1496-1504. https://doi.org/10.1002/ejlt.201400201

Wang, L., Wang, Y., Hu, C., Cao, Q., Yang, X. and Zhao, M. 2011. Preparation of diacylglycerol-enriched oil from free fatty acids using lecitase ultra-catalyzed esterification. Journal of the American Oil Chemists' Society 88 (10), 1557-1565. DOI 10.1007/s11746-011-1821-0

Wang, Y. and Huang, F. 2015. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation in obesity: local effect and systemic benefit. BioMed research international, 1-16. https://doi.org/10.1155/2015/581469

Xie, D., Chen, Y., Yu, J., Yang, Z., Wang, X. & Wang, X. (2023). Progress in enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acid: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63 (32), 11310-11326. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2086852.

Xu, X. 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. European journal of lipid science and technology 102 (4), 287-303. https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200004)102:4<287::AID-EJLT287 > 3.0.CO;2-Q

Yuan, Q., Ramprasath, V., Harding, S., Rideout, T. and Chan, Y. 2010. Diacylglycerol oil reduces body fat but does not alter energy or lipid metabolism in overweight, hypertriglyceridemic women. The Journal of Nutrition 140, 1122-1126. https://doi.org/10.3945/jn.110.121665

Zhao, T., Kim, B.H., Hong, S.I., Yoon, S.W., Kim, C.T., Kim, Y. and Kim, I. H. 2012. Lipase-catalyzed production of pinolenic acid concentrate from pine nut oil using a recirculating packed bed reactor. Journal of Food Science 77 (2), 267-271. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02562.x

Zhen Zhang, Fang Liu, Xiang Ma, Huihua Huang, and Yong Wang. 2018. Two-stage enzymatic preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) enriched fish oil triacylglycerols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66 (1), 218-227. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04101

Zhang, Z., Lee, W.J., Sun, X., and Wang Y. 2022. Enzymatic interesterification of palm olein in a continuous packed bed reactor: Effect of process parameters on the properties of fats and immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. LWT- Food Science and Technology 162 :113459. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113459

Zhu, Y., Feng, Y., Wang, J., Yuan, Z., Miao, Y., Miao, T., Gao, B. and Zhang, L. 2024. Selective esterification design of lipases for TAG synthesis based on the unique structure of curved DHA. ACS Food Science & Technology, 4 (7), 1722-1730. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00174

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Composición de gremios tróficos de invertebrados en un bosque de pino-encino en Durango

Composition of Invertebrate Trophic Guilds in a Pine - Oak Forest in Durango

María Fernanda Sánchez-Alfaro[1]✉, María Guadalupe Viggers-Carrasco[2]✉, José Gamaliel Castañeda-Gaytán[3]✉, Josué Raymundo Estrada-Arellano[3]✉ , Jorge Luis Becerra-López[3]✉ y Jesús Lumar Reyes-Muñoz[3]*✉

[1] Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango. Calle Sigma 119, Fracc. 20 de Noviembre II. C.P. 34220. Durango, México.

[2] Tecnológico Nacional de México-Campus del Valle de Guadiana. Carretera Durango-México, km. 22.5. C.P. 34371. Villa Montemorelos, Durango, México.

[3] Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad s/n, Fracc. Filadelfia, C.P. 35010. Gómez Palacio, Durango, México.

ABSTRACT

Mexico has a wide diversity of ecosystems, among which are different types of forests that cover almost 33 % of the country's territory. One of the main characteristics of these ecosystems is that they host a great diversity of organisms, including arthropods, who play an important role within these natural systems. The research was carried out in 3 sites at Pueblo Nuevo, Durango from September 2017 to March 2018. Twenty pit-fall traps and 10 necrophagous traps were used, as well as direct on-site specimen collection. A total of 18 251 organisms were collected that belonged to 20 orders and 67 families, grouped into eight trophic guilds, of which the detritivores were the most widely represented, followed by the coprophagous and the predatory. In the state of Durango there is an information void regarding the functions that these organisms perform in the forests, and therefore this research study has as its main objective to evaluate trophic guilds associated with a pine - oak forest.

Keywords: abundance, arthropods, diversity, ecosystem, insects.

RESUMEN

En el territorio mexicano se encuentra una amplia diversidad de ecosistemas, dentro de los cuales podemos mencionar diferentes tipos de bosques que ocupan casi 33 % del territorio nacional. Una de las características principales de estos ecosistemas es que presentan una alta diversidad de organismos, entre ellos los artrópodos quienes juegan roles importantes dentro de dichos sistemas naturales. El trabajo se realizó en 3 sitios de Pueblo Nuevo, Durango, durante septiembre 2017-marzo 2018. Se utilizaron 20 trampas pit-fall y 10 trampas necrófagas, así como muestreos directos en suelo. Se colectaron un total de 18,251 organismos pertenecientes a 20 órdenes y 67 familias, agrupados en ocho gremios tróficos, siendo los detritívoros el mejor representado, seguido de los coprófagos y depredadores. En el estado de Durango, existe un vacío de información acerca de las funciones que estos organismos realizan en los bosques, de tal manera que el presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar los gremios tróficos asociados a un bosque de pino-encino.

Palabras clave: abundancia, artrópodos, diversidad, ecosistema, insectos.

INTRODUCCIÓN

México cuenta con una extraordinaria diversidad de bosques, abarcando 33 % de su territorio nacional. En el estado de Durango 46.56 % de su territorio son bosques, predominando los templados de coníferas y encinos, así como pequeños enclaves de bosque mesófilo (SEMARNAT, 2017) en estos ecosistemas existe una gran diversidad de organismos, entre ellos los artrópodos.

Los artrópodos son un grupo de organismos muy diversos y tienen una gran capacidad de adaptación, lo que hace que se encuentren prácticamente en casi todos los ecosistemas (Pinkus-Rendón, 2010). Debido a ello se han descrito alrededor de 1 302 809 especies en el mundo (Zhang, 2013), y en México se conocen cerca de 108 519 especies, de las cuales 54.74 % son artrópodos (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008; CONABIO, 2020).

Los artrópodos juegan diferentes roles dentro de los ecosistemas al desempeñar diversas funciones, donde cada uno utiliza distintas fuentes de recursos como alimentos, agrupándose en gremios tróficos. (Chen y Wise, 1999; Moore *et al*., 2004). Dentro de los gremios tróficos están los depredadores, quienes en su mayoría son generalistas y no restringen su dieta a especies herbívoras, siendo el canibalismo un hábito alimenticio común dentro de este gremio, tal comportamiento puede llegar a ser un mecanismo de control poblacional efectivo, al disminuir el número de competidores intraespecíficos (Sabelis, 1992; Smith, 1996; Speight *et al*., 1999). Así mismo, están los fitófagos los cuales son fuente importante de alimento para depredadores y parasitoides, este gremio se alimenta de hojas, tallos y savia (Swift y Anderson, 1994; Speigth *et al*., 1999). Mientras que, los omnívoros son aquellos que se alimentan de dos o más niveles tróficos diferentes (Polis y Strong, 1996). Por último,

*Autor para correspondencia: Jesús Lumar Reyes-Muñoz
Correo-e: jesuslumar.reyes@ujed.mx
Recibido: 21 de diciembre de 2023
Aceptado: 8 de mayo de 2024
Publicado: 31 de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1924

el gremio de los descomponedores o detritívoros se alimentan de materia orgánica en descomposición, degradando componentes principales de las plantas (lignina y celulosa), además de materia de origen animal como cadáveres y excrementos (Galante y Marcos-García, 1997).

Actualmente muchos artrópodos son usados como bioindicadores al ser sensibles a cambios ambientales, particularmente los que son causados por las actividades antropogénicas (Rocha *et al*., 2010; Cameron y Leather, 2012; Niño-Maldonado y Sánchez-Reyes, 2017; Lucio-García *et al*., 2022). Estos organismos resultan útiles ya que, por su tamaño pequeño, corto ciclo de vida, las altas tasas reproductivas, la abundancia de muchas especies y además sus poblaciones se ajustan rápidamente a las condiciones los hace idóneos como herramienta para el monitoreo de la calidad ambiental, efectos del cambio a través del tiempo/espacio, y a su vez para distinguir modificaciones en el paisaje (Kremen *et al*., 1993; Schowalter, 2016).

Debido a la importancia de este grupo biológico, el principal objetivo de este trabajo es generar información al evaluar los gremios tróficos de artrópodos presentes en un bosque de pino encino en el municipio de Pueblo Nuevo, Durango, así como analizar la correlación de las abundancias de insectos con variables ambientales, como humedad, temperatura, precipitación, entre otras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se realizó al sur del Estado de Durango, en el municipio de Pueblo Nuevo, ubicado en la Sierra Madre Occidental, con una altitud que va de los 2500 a 2600 m. Presenta una precipitación media anual de 1300 milímetros cúbicos, con régimen de lluvias en los meses de junio-septiembre. Se eligieron tres localidades: Ejido Adolfo Ruiz Cortines (RC), Ejido San Esteban (SE) y la Reserva Ecológica de Santa Bárbara (SB) (Fig. 1).

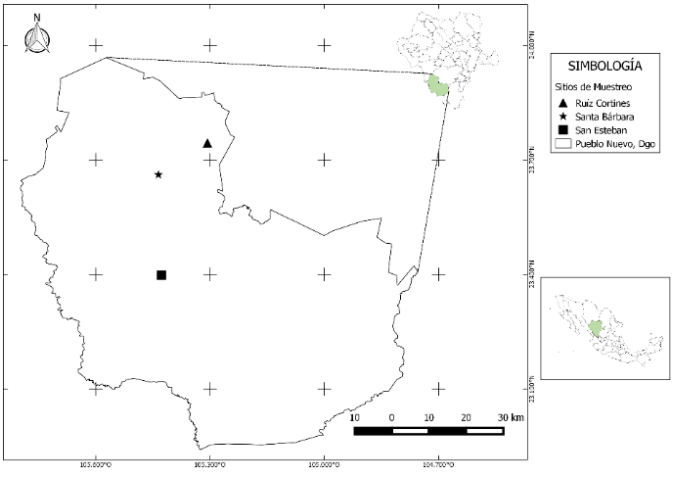


Figura 1. Localización geográfica del área de estudio.
Figure 1. Geographical location of the study area.

Métodos de muestreo

Se realizaron muestreos de septiembre de 2017 a marzo de 2018. Los sitios de muestreo cuentan con características particulares de vegetación (Tabla 1), además, RC y SE cuentan con un manejo forestal mientras que, SB al ser una reserva protegida no hay aprovechamiento forestal.

Para la instalación y monitoreo de trampas se modificó la metodología propuesta por Márquez-Luna (2005) y Cheli y Corley (2010) de la siguiente manera: en cada sitio de muestreo se eligió una superficie de 500 m^2 al azar instalándose un total de 30 trampas (Fig. 2) las cuales se fabricaron con contenedores plásticos (1000 mL) y contenedores de aluminio (355 mL).

Tabla 1. Características y coordenadas de los sitios de muestreo.
Table 1. Characteristics and coordinates of the sampling sites.

	Sitio 1 (S1)	Sitio 2 (S2)	Sitio 3 (S3)
Características	**Adolfo Ruiz Cortines**	**San Esteban**	**Santa Bárbara**
Coordenadas	23° 44′ 39.82″ N, 105° 18′ 23.99″ O	23°23′52.10″ N 105° 25′ 38″ O	23° 39′ 39.12 ″N, 105° 26′ 7.03″ O
Altitud	2 550 m snm	2 400 m snm	2 721 m snm
Tipo de Vegetación	*Pinus* spp *Quercus* spp	*Pinus cooperi P. durangensis P. engelmannii P. leiophylla*	*Picea chihuahuana Abies durangensis Pseudotsuga menziesii*

Se colocaron las trampas de manera aleatoria, 20 trampas pitfall al ras de la superficie del suelo en dos transectos de 100 m (10 trampas por transecto), con una separación de 10 m entre cada trampa, como preservador se utilizaron 180 mL de anticongelante, se dejaron activas durante 15 días y fueron revisadas cada 7 días. Se colocaron 10 necrotrampas cebadas con calamar en dos transectos al azar de 50 m (5 trampas por transecto), con una separación de 10 m entre cada trampa, dejándose activas durante 7 días (Fig. 2).

Simultáneamente, se realizaron muestreos directos de suelo, utilizando el método descrito en el libro Tropical Soil Biology and Fertility (Anderson e Ingram, 1989) , el cual consistió en la elaboración de monolitos de 30 x 30 cm^2 de área , de 10 a 30 cm de profundidad según la época del año correspondiente, puesto que a menor temperatura los organismos edáficos se encuentran a mayor profundidad, la hojarasca superficial del monolito fue retirada y revisada manualmente, de esta manera se colectaron los individuos epigeos, posteriormente la muestra de suelo colectada se trasladó al laboratorio para ser separada en charolas de plástico para su tamizado, se utilizó un tamiz con apertura de 2 mm, de esta manera con ayuda de lupas, pinceles, pinzas y lámparas se separaron manualmente los organismos encontrados en el sustrato (Anderson e Ingram, 1989).

Adicionalmente, se instalaron sensores automatizados tipo *HOBO* (*Familia H8, Forestry Suppliers*, Inc.) en cada sitio de muestreo, para registrar la temperatura ambiente (°C), temperatura de suelo y humedad. Con un pluviómetro automatizado *Davis*® S-RGC-M00 conectado a un sensor *HOBO*



Figura 2. Trampas A) necrotrampas, B) pit-fall en época de secas y C) pit-fall en época de lluvia.
Figure 2. Taps A) necrotramps, B) pit-fall in dry seasons and C) pit-fall in rainy seasons.

Event Onset, se cuantificó la cantidad diaria de precipitación pluvial (mm^3) durante los meses de muestreo.

Por último, las muestras obtenidas fueron separadas y colocadas en frascos con alcohol al 70 % para su preservación, traslado y depósito en el laboratorio de Zoología del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, en donde se llevó a cabo el tratamiento curatorial correspondiente, así como su identificación taxonómica a nivel familia, empleando para ello claves de identificación taxonómica especializadas (Arnett *et al*., 2002; Triplehorn y Johnson, 2005). Ya identificados los organismos fueron debidamente etiquetados y preservados en viales con alcohol al 70 %, posteriormente se definieron los gremios tróficos de acuerdo con Brown *et al*. (2001).

RESULTADOS Y DISCUSION

En los tres sitios de muestreo se colectaron un total de 18,251 individuos en el periodo de septiembre del 2017 a marzo del 2018, agrupados en 20 órdenes y 67 familias, pertenecientes a ocho gremios tróficos. La composición de familias de invertebrados encontradas en el bosque de pino-encino descrita en la Tabla 2 coinciden con el estudio realizado por Brown *et al*. (2001), quienes realizaron una recopilación de trabajos realizados en Veracruz y otros estados, encontrando 20 órdenes, 107 familias y nueve gremios, de los cuales 13 órdenes, 27 familias y siete gremios tróficos coinciden con el presente estudio, los órdenes no encontrados fueron Isoptera, Homoptera, Isopoda, Diplura, Pseudoescorpion, Trochida y Julida. Es probable que la ausencia de estos órdenes se deba a la diferencia de ecosistemas de ambos trabajos, ya que el estudio de Brown *et al*. (2001) se realizó mayormente en diferentes ecosistemas en el sureste de México.

En los tres sitios se encontraron ocho categorías tróficas, siendo los detritívoros el gremio más representado con 9,635 individuos (52.79 %), seguido por los depredadores con 2,836 (15.53 %) y coprófagos con 2,305 (12.62 %). Los 3,475 (19.06 %) organismos restantes estuvo conformado por gremios: fitófagos, necrófagos, nectarívoros, omnívoros y parasitoides (Tabla 2). El gremio de los detritívoros cumple una función de vital importancia en el suelo al degradar materia orgánica, dentro de este gremio las familias más abundantes pertenecen al Orden de los colémbolos y ácaros, siendo los grupos con mayor abundancia en la hojarasca y suelo, además su presencia se registra a lo largo de todo el año y no solo en algunas épocas (Varela *et al*., 2007). Así mismo, dentro de este gremio se encuentran las lombrices, quienes contribuyen a porcentajes altos de degradación y de acuerdo con Fragoso *et al*. (2001) estos organismos se encuentran presentes en ambientes húmedos y no tan perturbados, concordando con este trabajo donde la mayor abundancia de lombrices fue en SB, sitio con mayor humedad y menor perturbación al ser una Reserva Ecológica. Aunque en los otros sitios de muestreo la presencia de estos organismos se mostró en menor cantidad, probablemente esto se deba a factores como la baja cantidad de materia orgánica y compactación de suelo, este último factor es determinante para el desarrollo y mantenimiento de las comunidades de lombrices, es decir, entre más alto el porcentaje de compactación, hay una disminución en el tamaño de las poblaciones de lombrices (Domínguez *et al*., 2009).

Así mismo, el gremio de los depredadores obtuvo una alta abundancia de individuos y familias, que en su mayoría pertenecen al Orden Araneae y Coleoptera, los cuales cumplen funciones importantes en el ecosistema ya que pueden llegar a ser controladores biológicos de especies perjudiciales para el ecosistema, así como para regular las poblaciones presentes en el mismo (Urbaneja *et al*., 2005).

Los coprófagos (Coleoptera: Scarabaeida: Scarabaeinae) por su parte obtuvieron su mayor abundancia en el sitio RC, sus altas abundancias pudieran estar estrechamente relacionados a la existencia cercana de un área de manejo de ganado bovino, y de acuerdo con Favila y Díaz (1997) y Escobar (2000) estos escarabajos están asociados a este tipo

Tabla 2. Número de individuos colectados por sitio, separados en órdenes y familias.
Table 2. Number of individuals collected by site, separated into orders and families.

No.	Orden	No.	Familia	Sitio/ Número de individuos		
				RC	SE	SB
1	Araneae	1	Amaurobiidae	8	2	0
		2	Araneidae	15	0	0
		3	Clubionidae	0	17	47
		4	Ctenizidae	3	1	2
		5	Dictynidae	3	0	0
		6	Lycosidae	127	62	6
		7	Pisauridae	0	18	0
		8	Salticidae	7	1	3
		9	Thomisidae	14	7	2
2	Archaeognatha	10	Meinertellidae	48	4	8
3	Blattodea	11	Blattidae	233	117	46
4	Coleoptera	12	Cantharidae	1	0	1
		13	Carabidae	84	202	196
		14	Curculionidae	0	5	4
		15	Histeridae	32	72	3
		16	Lampyridae	1	0	0
		17	Scarabaeidae	2,098	145	62
		18	Silphidae	377	193	20
		19	Staphylinidae	135	122	192
		20	Tenebrionidae	12	6	0
		21	Trogidae	6	8	15
5	Collembola	22	Entomobryoidea	673	1,391	893
		23	Hypogastruroidea	1	0	2
		24	Isotomoidea	3	0	0
		25	Onychiuroidea	97	219	0
		26	Sminthuroidea	20	18	42
6	Dermaptera	27	Forficulidae	0	0	5
7	Diptera	28	Anthomyiidae	0	0	16
		29	Calliphoridae	146	53	100
		30	Dolichopodidae	38	4	22
		31	Drosophilidae	365	308	890
		32	Empididae	0	3	0
		33	Heleomyzidae	48	77	41
		34	Muscidae	118	83	150
		35	Mycetophilidae	68	130	862
		36	Otitidae	7	0	0
		37	Phoridae	25	179	78
		38	Sarcophagidae	2	17	2
		39	Sciaridae	2	231	51
		40	Tachinidae	24	18	14
		41	Tipulidae	0	0	24
8	Hemiptera	42	Largidae	34	2	5
		43	Lygaeidae	17	1	19

No.	Orden	No.	Familia	Sitio/ Número de individuos		
				RC	SE	SB
		44	Miridae	145	19	7
		45	Pentatomidae	2	0	2
		46	Reduviidae	49	0	47
9	Hymenoptera	47	Apidae	2	1	4
		48	Braconidae	1	20	10
		49	Formicidae	292	504	34
		50	Ichneumonidae	19	13	23
		51	Pompilidae	0	0	1
		52	Vespidae	7	2	10
10	Julida	53	Julidae	1	3	69
11	Lepidoptera	54	Geometridae	9	6	5
		55	Noctuidae	0	2	0
12	Mesostigmata	56	Macrochelidae	1,095	1,591	385
13	Opiliones	57	Phalangiidae	58	120	134
		58	Cosmetidae	0	4	0
14	Opisthopora	59	Lumbricidae	92	29	232
15	Orthoptera	60	Acrididae	83	4	0
		61	Gryllidae	71	252	1
		62	Tettigoniidae	7	42	61
16	Scolopendromorpha	63	Scolopendridae	1	0	2
17	Scorpiones	64	Vejovidae	2	0	0
18	Solifugae	65	Eremobatidae	0	1	0
19	Stylommatophora	66	Arionidae	3	1	11
20	Trombidiformes	67	Erythraeidae	9	2	0
			*Larvas	49	103	66

** RC= Ruiz Cortines // SE= San Sebastián // SB= Santa Bárbara

de mamíferos, siendo el excremento su principal fuente de alimento y refugio. La presencia de este gremio trófico puede generar beneficios al ecosistema al participar activamente en el reciclaje de nutrientes en el suelo, incorporando la materia orgánica en descomposición e incrementando la fertilidad del suelo, acelerando la incorporación del estiércol al ciclo de nutrimentos edáficos (Basto-Estrella *et al*., 2012).

Los resultados mostrados en la Figura 3 corresponden al climograma del sitio RC, donde la temperatura ambiental y del suelo presentan valores similares, comparándolos con los individuos, la abundancia de estos disminuye en relación con las temperaturas más bajas presentadas en los meses de diciembre y enero, además, se observa que en el mes de febrero y marzo las temperaturas aumentan simultáneamente con la abundancia de los organismos. La presencia de organismos en el mes de octubre se relacionó con la precipitación y humedad relativa.

En la Figura 4 se describe el climograma de SE donde la temperatura de suelo fue más baja que la temperatura ambiente. Sin embargo, las temperaturas y la humedad fueron constantes, por lo que, la abundancia de los individuos fue más uniforme, en diciembre y enero se observó un declive en las temperaturas y organismos. El mes donde se encontraron más organismos fue en febrero con un total de 1,525 organismos.

En el climograma de SB la temperatura de suelo y ambiente fueron similares, no obstante, este sitio mostró las temperaturas y abundancias más bajas en comparación al resto. El mes con mayor presencia de organismos fue noviembre y la menor abundancia en marzo. Pese a que en diciembre se presentó mayor precipitación, hubo un declive en el número de organismos debido a nevadas en el sitio, las cuales influyeron en las abundancias. Por último, la nula precipitación en el mes de marzo pudo afectar la presencia de organismos.

En los climogramas de los tres sitios se puede observar que los parámetros físicos (humedad, temperatura y precipitación) pueden estar relacionados con las abundancias de los organismos, ya que, en los meses con precipitación, temperatura mayor a los 12°C y humedad mayor al 60 %, las abundancias aumentaron, mientras que, en los meses en donde estos parámetros fueron menores a los ya men-

Tabla 3. Número de individuos colectados en los tres sitios, agrupados por gremios tróficos y separados por familias.
Table 3. Number of individuals collected at the three sites, grouped by trophic guilds and separated by families.

Gremio	Familias				Total, de Individuos
Coprófago	Scarabaeidae				2,305
Detritívoro	Blattidae	Julidae	Otitidae		
	Entomobryidae	Lumbricidae	Phoridae		
	Forficulidae	Macrochelidae	Sciaridae		
	Hypogastruridae	Meinertellidae	Sminthuridae		
	Isotomidae	Mycetophilidae	Staphylinidae		
		Onychiuridae	Tenebrionidae		9,417
Necrófago	Calliphoridae	Silphidae	Miridae		
	Histeridae	Trogidae	Noctuidae		
	Muscidae	Acrididae			
	Sarcophagidae	Anthomyiidae			1,397
Fitófago	Arionidae	Lampyridae	Reduviidae		
	Curculionidae	Largidae	Tettigoniidae		
	Geometridae	Lygaeidae			
	Heleomyzidae	Pentatomidae			775
Nectarívoro	Apidae				7
Omnívoros	Formicidae	Cantharidae	Tipulidae		
	Gryllidae	Empididae	Vespidae		
	Amaurobiidae	Eremobatidae			
	Araneidae	Erythraeidae			1,152
Depredador	Carabidae	Dolichopodidae	Pompilidae		
	Clubionidae	Braconidae	Salticidae		
	Cosmetidae	Lycosidae	Scolopendridae		
	Ctenizidae	Phalangiidae	Thomisidae		
	Dictynidae	Pisauridae	Drosophilidae		
			Vaejovidae		2,838
Parasitoide	Ichneumonidae	Tachinidae			142
				Total	**18,033**
				Larvas	**218**
				Total	**18,251**

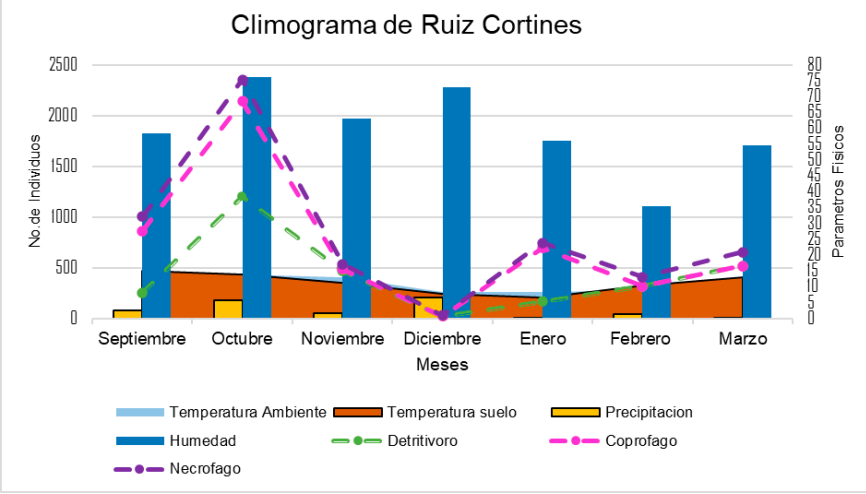


Figura 3. Climograma de RC con relación a las abundancias de insectos.
Figure 3. Climogram of CR in relation to the abundances of insects.

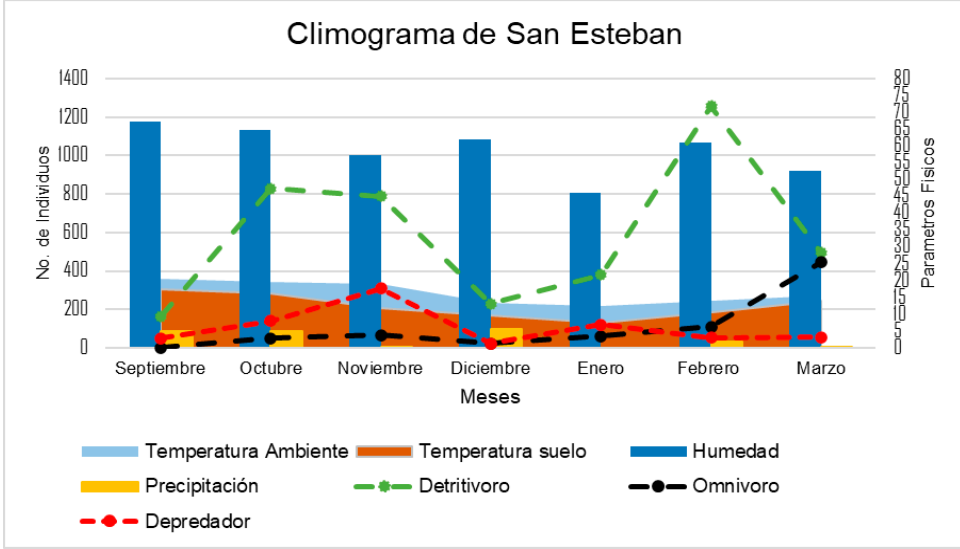


Figura 4.- Climograma de SE con relación a las abundancias de insectos.
Figure 4.- Climogram of SE in relation to the abundances of insects.

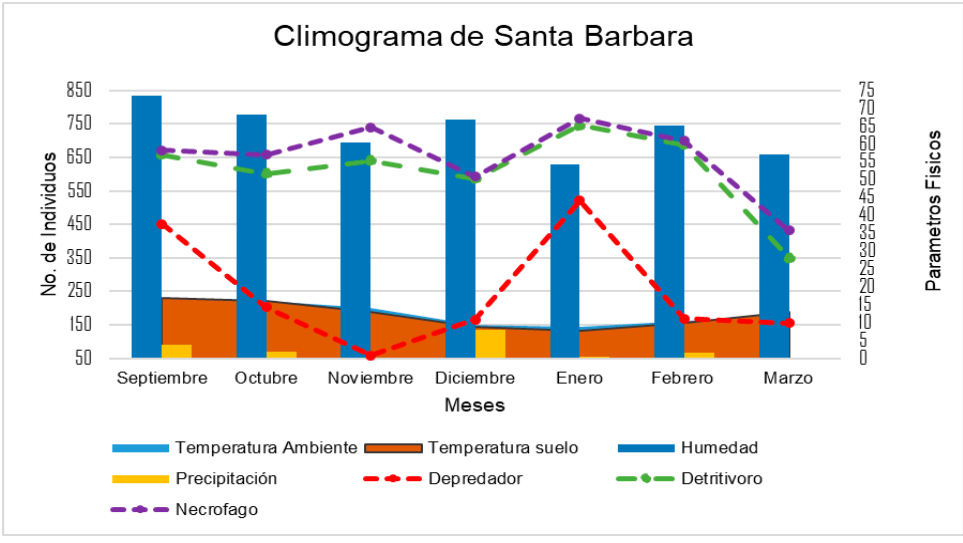


Figura 5.- Climograma de SB con relación a las abundancias de insectos.
Figure 5.- Climogram of SB in relation to the abundances of insects.

cionados las abundancias disminuyeron, lo que concuerda con Barraza *et al*. (2010) encontrando mayor abundancia en época de lluvias, esto puede deberse a que en esta época el suelo se encuentra menos compactado y les resulta más fácil emerger a los organismos, dado que la mayoría de individuos reportados tienen sus ciclo de vida mayormente en el suelo.

Por otra parte, en SE las abundancias pudieron verse afectadas ya que es un sitio con manejo forestal, además que, en el mes de septiembre las trampas fueron saqueadas, sin embargo, esto no sesgó los resultados, ya que solo se dio en dicho mes. En RC hubo mayor abundancia de coprófagos, ya que cerca del sitio de muestreo existe una zona de manejo bovino. Finalmente, en SB la abundancia y diversidad fue menor a pesar de ser una reserva y carecer de manejo forestal, sin embargo, es el sitio con mayor altitud.

CONCLUSIONES

Durante el periodo de septiembre del 2017 a marzo del 2018, se recolectó un total de 18,251 individuos pertenecientes a 20 órdenes, 67 familias agrupados en ocho gremios tróficos.

El gremio detritívoro fue el que presentó mayor número de individuos, mientras que, nectarívoro fue el menos abundante, el sitio que presentó mayor número de familias y mayor abundancia fue RC. Las familias con mayor número de individuos fueron Macrochelidae, Entomobryidae y Scarabaeidae con 3071, 2957 y 2305 ejemplares, respectivamente.

La abundancia de organismos decrece o se incrementa debido a los factores ambientales que se presentan a lo largo del año, pues en los meses donde se presentó mayor humedad, precipitación y temperaturas altas los organismos fueron más abundantes, siendo estas variables un factor para efectos positivos o negativos sobre las poblaciones y diversos taxa.

Por último, es trascendental conocer el papel que desempeñan los artrópodos y las relaciones ecológicas que cada uno aporta en el ecosistema, ya que al entender las interacciones entre los diferentes gremios tróficos se generaría más información acerca del funcionamiento dentro del mismo. Es conveniente la realización de más estudios entomofaunísti-

cos y de diversidad en zonas de bosques en el estado de Durango, al ser estos organismos bioindicadores ambientales se pudieran realizar en estudios futuros propuestas de manejo, monitoreo y conversación de estos ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tilo Gustavo Domínguez Gómez por la contribución a la obtención de datos gracias al Proyecto SEP-ITM-ITESA-PTC-002, Caracterización de los Servicios Ecosistémicos Bosques Mixto de la Sierra Madre Occidental en la Región de el Salto, Durango, México, a la Biol. María Guadalupe Viggers Carrasco por su asesoría en la elaboración y procesamiento de datos en el Instituto Tecnológico Valle del Guadiana y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT).

CONFLICTO DE INTERESÉS

Los autores participantes en éste documento hacen constar que no presentan ningún conflicto de intereses para la publicación de este documento.

REFERENCIAS

Anderson, J. M., y Ingram, J. S. I. 1989. Tropical soil biology and fertility. Wallingford: CAB international.

Arnett, R. H., Thomas, M. C., Skelley, P. E., y Frank, J. H. (Eds.). (2002). American Beetles, Volume II: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea (Vol. 2). CRC press.

Barraza, J. M., Montes, J. F., Martínez, N. H., y Deloya, C. 2010. Ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) del Bosque Tropical Seco, Bahía Concha, Santa Marta (Colombia). Revista Colombiana de Entomología, 36(2), 285. doi.org/10.18257

Basto-Estrella, G., Rodríguez-Vivas, R. I., Delfín-González, H., y Reyes-Novelo, E. 2012. Escarabajos estercoleros (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de ranchos ganaderos de Yucatán, México. Revista mexicana de biodiversidad, 83(2), 380-386.

Brown, G., Fragoso, I., Barois, P., Rojas, J., Patrón, J., Bueno, A., y Ortiz, V. 2001. Diversidad y rol funcional de la macrofauna edáfica en los ecosistemas tropicales mexicanos. Acta Zoológica Mexicana, 79-110.doi.org/10.21829/azm.2001.8401847

Cameron, K. H., y Leather, S. R. 2012. How good are carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) as indicators of invertebrate abundances and order rinches?. Biodiversity and Conservation, 21, 763-779.doi.org/10.1007/s10531-011-0215-9

Cheli, G. H., y Corley, J. C. 2010 Efficient sampling of ground-dwelling arthropods using pitfall traps in arid steppes. Neotropical Entomology, 39, 912-917.

Chen, B., y Wise, D. H. 1999. Bottom-up limitation of predaceous arthropods in a detritus-based terrestrial food web. Ecology, 80, 761-772.doi.org/10.2307/177015

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO]. 2020. ¿Cuántas especies hay?. Recuperado de https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp.htm

Domínguez, A., Bedano, J. C., y Becker, A. R. 2009. Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina. Ciencia del suelo, *27*(1), 11-19.

Escobar, F. 2000. Estudio de la comunidad de coleópteros coprófagos (Scarabaeidae) en un remanente de bosque seco al norte del Tolima, Colombia. Caldasia, 3, 419-430.

Favila, M. E., y Díaz, A. 1997. Escarabajos coprófagos y necrófagos. Historia Natural De Los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México: 383-384.

Fragoso, C., Reyes Castillo, P., y Rojas, P. 2001. La importancia de la biota edáfica en México. Acta Zoológica Mexicana, 1,1-10

Galante, E., y Marcos-García, M. A. 1997. Detritívoros Coprófagos y Necrófagos. Sociedad Aragonesa de Entomología, 20,57-64.

Kremen, C., Colwell, R. K., Erwin, T. L., Murphy, D. D., Noss, R. A., y Sanjayan, M. A. 1993. Terrestrial arthropod assemblages: their use in conservation planning. Conservation biology, 796-808.

Llorente-Bousquets, J., y Ocegueda, S. 2008. Estado del conocimiento de la biota. Capital Natural de México, 1, 283-322.

Lucio-García, J. N., Sánchez-Reyes, U. J., Horta-Vega, J.V., Reyes-Muñoz, J.L., Clark, S.M. y Niño-Maldonado, S. 2022. Seasonal and microclimatic effects on leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) in a tropical forest fragment in northeastern Mexico.ZooKeys,1080,21-52. https://doi.org/10.3897/zookeys.1080.76522

Márquez -Luna, J. M. 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 37, 385-408.

Moore, J. C., Berlow, E. L., Coleman, D. C., Ruiter, P. C., Dong, Q., Hastings, A., Johnson N. C., McCann, K. S., Melville, K., Morin, P. J., Nadelhoffer, K., Rosemond, A. D., Post D. M., Sabo, J. L., Scow, K. M., Vanni, M. J., y Wall, D. H. 2004 Detritus, trophic dynamics and biodiversity. Ecology Letters, 7, 584-600. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00606.x

Niño-Maldonado, S., y Sánchez-Reyes, U. J. 2017. Taxonomía de insectos. Orden Coleoptera. Familia Chrysomelidae. En Cibrián-Tovar D (Ed.) Fundamentos de entomología forestal, 282-288. UACH.

Pinkus-Rendón, M. Á. 2010. El hombre y los artrópodos: un vínculo inalienable. Península, 5, 81-100.

Polis, G. A., y Strong, D. R. 1996. Food web complexity and community dynamics. The American Naturalist, 147, 813-846.

Rocha, J., Almeida, J. R., Lins, G. A., y Durval, A. 2010. Insects as indicators of environmental changing and pollution: a review of appropriate species and their monitoring. Holos Environment, 10, 250-262. https://doi.org/10.14295/holos.v10i2.2996

Sabelis, M. W. 1992. Predatory arthropods. Natural Enemies: The population biology of predators, parasites and diseases, 225-264.

Schowalter, T. D. 2016. Insect ecology: an ecosystem approach. Academic press.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Forestal. Recuperado de www.gob.mx/attachment/file/542586/2017.pdf

Smith, R. 1996. Ecology and field biology. Harper Collins. College Publishers. New York.

Speight, M., Hunter, M., y Watt, A. 1999. Ecology of insects. Concepts and applications. Malden, USA. Blackwell Science.

Swift, M. J., y Anderson, J. M. 1994. Biodiversity and ecosystem function in agricultural systems. Biodiversity and ecosystem function. Springer, Berlin, Heidelberg

Triplehorn, C. A., y Johnson, N. F. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects, 7th ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA

Urbaneja, A., Castañera Domínguez, P., Vanaclocha, P., Tortosa, D., Jaques, J. A., Calvo, J., y Abad-Moyano, R. 2005. Importancia de los artrópodos depredadores de insectos y ácaros en España. Boletín de Sanidad Vegetal, 31, 209-224.

Varela, A., Cortés, C., y Cotes, C. 2007. Cambios en la edafofauna asociada a descomposición de la hojarasca en un bosque nublado. Revista Colombiana De Entomología, 33, 45-53.

Zhang, Z. Q. 2013. Phylum Arthropoda. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). Zootaxa, 3703(1), 17-26.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Riqueza y distribución de quelites de Durango, México: un análisis basado en datos del GBIF

Richness and distribution of quelites from Durango, Mexico: an analysis based on GBIF data

Hugo Manuel Monreal-García[1,2*], Norma Almaraz Abarca[2], José Antonio Ávila-Reyes[2], Rene Torres-Ricario[2], Eli Amanda Delgado-Alvarado[2], Marcela Verónica Gutiérrez-Velázquez[2], Ana Carolina González-Trillo[2], Andrés Vasavilbazo-Saucedo[3]

[1] Programa de Estancias Posdoctorales por México, Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, México.
[2] Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Durango, México.
[3] Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar, Paseo Claussen s/n Colonia Los Pinos, Mazatlán, Sinaloa, México.

RESUMEN

Las plantas silvestres han sido desde tiempos prehispánicos una fuente importante de alimento para los mexicanos. Un grupo de alto valor nutritivo representativo de estas plantas y presente en la gastronomía mexicana son los quelites, cuyas hojas, tallos y flores se consumen tiernos. En algunas regiones de México, como Durango, existe poca información sobre la diversidad y distribución de especies de quelites. El objetivo de este trabajo trabajo fue analizar el estado actual del conocimiento sobre la relevancia de los quelites en la alimentación de la población del estado de Durango, México, y elaborar mapas de riqueza y distribución utilizando las bases de datos del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF). Considerando la literatura y el GBIF, se seleccionó un total de 39 especies pertenecientes a 15 familias botánicas, las cuales se encontraron distribuidas principalmente a lo largo de la Sierra Madre Occidental (SMO). Los municipios con mayor riqueza de especies fueron: Durango, Nombre de Dios, Súchil y Vicente Guerrero. Este tipo de estudios son esenciales para revalorizar los quelites como alimento altamente nutritivo, promover su producción y por lo tanto el desarrollo económico local, y contribuir a su conservación y uso sostenible, así como a la seguridad alimentaria de México.

Palabras clave: Quelites, plantas silvestres comestibles, Durango.

ABSTRACT

Wild plants have been an important food source for mexicans since pre-hispanic times. A highly nutritious group, which is representative of these plants and a valuable element of Mexican gastronomy, is that of quelites, whose leaves, stems, and flowers are consumed when tender. For some regions of Mexico, such as Durango, information about the diversity and distribution of quelite species is limited. This study aimed to analyze the current state of knowledge about the relevance of quelites in the nutrition of the population of the State of Durango, Mexico, as well as create richness and distribution maps using the Global Biodiversity Information Facility (GBIF) databases. Considering the literature and the GBIF, 39 species belonging to 15 botanical families were selected, mainly distributed throughout the Sierra Madre Occidental (SMO). Durango, Nombre de Dios, Súchil, and Vicente Guerrero were revealed as municipalities with the highest species richness. Studies such as the present one are essential to revalue quelites as highly nutritious foods, promote their cultivation and local economic development, and contribute to their conservation and sustainable use and the food security of Mexico.

Key words: Quelites, edible wild plants, Durango.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de mejorar y descubrir nuevas fuentes de alimentación está ligada a la disponibilidad de recursos que la biodiversidad de una región o país posee (Guadarrama-Martínez *et al*., 2022). En el caso de México, se reconocen 15 provincias fisiográficas y 14 biogeográficas, así como seis zonas ecológicas y 45 ecorregiones terrestres (Carrasco-Ortiz *et al*., 2019). Estos factores contribuyen a que el país albergue una gran riqueza de especies vegetales, las cuales desempeñan un papel fundamental en el sustento de numerosos componentes de la biodiversidad (Villaseñor *et al*., 2022).

Se calcula que en México crecen aproximadamente 23,314 especies de plantas vasculares, distribuidas en 73 órdenes, 297 familias y 2,854 géneros, de las cuales más del 50% son endémicas (Villaseñor, 2016). Actualmente, se estima que, del total de las especies reconocidas en el país, 7,461 tienen algún tipo de uso, particularmente, 2,168 son consideradas comestibles (Mapes y Basurto, 2016), y cerca del 89% de éstas son silvestres (Narváez-Elizondo, 2020).

La recolección de plantas silvestres como fuente de alimento ha sido un recurso alternativo valioso en la dieta de la población indígena y rural de México. Esta actividad está relacionada en muchos casos con conocimientos ancestrales, los cuales forman parte del patrimonio cultural de los habitantes del país. Las plantas silvestres comestibles han jugado un papel importante en garantizar la seguridad alimentaria,

*Autor para correspondencia: Hugo Manuel Monreal-García
Correo-e: hugo.monreal@gmail.com
Recibido: 20 de junio de 2024
Aceptado: 31 de octubre de 2024
Publicado: 6 de diciembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2379

ya que muchas tienen propiedades nutritivas relevantes (Pascual-Mendoza *et al*., 2023). Esto ha ayudado en la subsistencia de familias y comunidades alrededor del mundo, ya que son económicamente accesibles. En México, estas plantas continúan utilizándose ampliamente (Sandoval-Ortega *et al*., 2023), destacando su uso medicinal (Medrano-Guerrero *et al*., 2023). Actualmente, diferentes grupos étnicos del país las emplean como principal remedio para tratar diferentes enfermedades (Ávila-Uribe *et al*., 2016).

Dentro de la amplia diversidad de especies silvestres presentes en México, sobresale el grupo denominado quelites. Los quelites son plantas verdes cuyas hojas, tallos y flores tiernas son comestibles y han sido consumidas como verduras o usadas con propósitos medicinales desde épocas prehispánicas. En el grupo de los quelites se incluyen especies de plantas que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos (Santiago-Saenz *et al*., 2019), que crecen en la milpa y fuera de ella, nativas o introducidas de otras partes del mundo (Linares y Bye, 2015).

Los quelites son una excelente fuente de proteína, nutrientes inorgánicos y otros micronutrientes esenciales (Balcázar-Quiñones *et al*., 2020; Morales-Valenzuela *et al*., 2022). Además, son una fuente importante de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, carotenoides y betalaínas, que tienen efectos benéficos en la salud humana (Santiago-Saenz *et al*., 2019; Román-Cortés *et al*., 2018).

Dado que los quelites no son conocidos en muchas zonas del territorio nacional y que el conocimiento tradicional se está perdiendo (Martínez *et al*., 2021), algunos autores han propuesto su preservación exaltando sus beneficios nutricionales y nutracéuticos mediante su difusión en medios como las redes sociales. Estas acciones pueden contribuir a aumentar la conciencia de sus beneficios para la salud e implementar políticas y estrategias sociales que incentiven y faciliten la conservación de estos alimentos (Pacheco-Hernández *et al*., 2022).

En el estado de Durango, son pocos los estudios que han reportado el uso y consumo de especies de quelites. Uno de ellos es el de Narváez-Elizondo *et al*. (2020), en el cual se detalla la utilización de varias especies por parte de la comunidad tepehuana del sur del estado. Otros estudios enfocados en la caracterización química y genética de especies consideradas quelites, que crecen en el estado, son el de Gutiérrez-Velázquez *et al*. (2018, 2024), sobre la composición fenólica y variabilidad genética de berro (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), y los de Castro *et al*. (2011a, 2011b) y González-Elizondo *et al*. (2004), en los que se menciona la presencia en el estado de verdolaga (*Portulaca oleracea*), lengua de vaca (*Rumex crispus*) y pápalo (*Porophyllum ruderale*), entre otras.

Por lo tanto, en esta investigación, se analizó la literatura disponible sobre la relevancia de los quelites en la alimentación de la población del estado de Durango, México y se registró la presencia de las especies reportadas. Con esta información y utilizando datos del GBIF se elaboraron mapas de riqueza y distribución de quelites para el estado de Durango. Lo anterior con el propósito de dar a conocer la diversidad de especies de quelites que crecen en Durango y se puedan implementar estrategias de conservación y apovechamiento sostenible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se buscaron y consultaron artículos y páginas de internet sobre los quelites publicados en los últimos 20 años, en las bases de datos de Scopus, Web of Science y Google escolar. Además, se consultó la base de datos de del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF) disponible en internet. La plataforma GBIF recoge información digitalizada de herbarios como el CIIDIR, ENCB, MEXU, IEB, CHAP, entre otros, además de los datos de las plataformas iNaturalist y Tropicos (GBIF, 2024a). Para la selección de los quelites del estado de Durango, se tomó en cuenta su presencia documentada en la literatura, así como su identificación a nivel de género y especie. Además, se consideró que cumplieran con la definición de quelite según Bye y Linares (2011), la cual engloba a aquellas plantas cuyas hojas y tallos tiernos son comestibles, consumidas tanto en su estado crudo como cocinado.

Una vez seleccionadas las especies de quelites, se generaron mapas de distribución dentro del estado de Durango con un sistema de información geográfica, considerando los 39 municipios y las cuatro ecorregiones de Durango (González-Elizondo *et al*., 2007). Estos mapas se elaboraron con los registros disponibles que proporcionó el complemento GBIF Occurrences 0.3.2 con el programa QGIS versión 3.32.3-Lima (2023) (QGIS Development Team, 2023), los datos pueden ser cosultados en GBIF Occurrence Download (https://www.gbif.org/). Antes de utilizar los datos del GBIF, se eliminaron los registros duplicados utilizando las herramientas de QGIS, como lo recomienda De Melo *et al*. (2024).

Con la información del GBIF se construyó también un mapa de riqueza de especies por celda (unidad de latitud y longitud). Se utilizó la metodología de Chávez-Hernández y Alvarado-Cárdenas (2022) para determinar el tamaño de celda. Para ello, se midió la distancia entre los puntos más alejados de los registros de cada especie y se promediaron todas las mediciones, finalmente, se tomó el 10% del promedio. El valor resultante se consideró como el tamaño de celda (0.29°). Se definió la riqueza como el número total de especies presentes en cada celda (Aragón-Parada *et al*., 2019). El mapa se realizó utilizando el programa QGIS versión 3.32.3-Lima (2023) (QGIS Development Team, 2023).

Adicionalmente, se visitaron los principales mercados y supermercados de la capital del estado de Durango, así como sus páginas de internet, para conocer la oferta-preferencia de consumo de los quelites comerciales por parte de la ciudadanía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los quelites de Durango

González-Elizondo *et al*. (2017) estimaron que en Durango se aprovechan cerca de 200 especies de plantas silvestres comestibles y/o medicinales, que se consumen como infusión o como alimento (frutos, hojas, semillas, flores, tallos y raíces), algunas de ellas de manera ocasional.

Actualmente, no se cuenta con registros específicos regionales o nacionales de quelites (Linares y Bye, 2015). Según la información disponible para el estado de Durango, los estudios se limitan a investigaciones sobre los quelites consumidos por algunos grupos étnicos en el estado, tal como el de Cedano-Maldonado *et al*. (2023), quienes reportaron que el pueblo Wixáritari (Huichol), presentes en los estados de Jalisco, Nayarit y pequeñas áreas de Durango (municipio de El Mezquital) y Zacatecas, incluyen en su dieta más de 131 especies de plantas comestibles, siendo la mayoría silvestres. Entre las especies consumidas mencionaron las hojas y los tallos crudos de *Convolvulus sp*., *Medicago sativa*, *Oxalis hernandezii*, *Zornia reticulata*, *Amaranthus hybridus* y *Portulaca oleracea*.

Narváez-Elizondo *et al*. (2020) registraron 122 especies (agrupadas en 84 géneros y 46 familias) de plantas silvestres comestibles usadas por los tepehuanos del sur de Durango, de las cuales, las familias más comunes fueron: Fabaceae (13 especies), Asparagaceae (11 especies), Cactaceae (9 especies), Solanaceae (9 especies), Asteraceae (7 especies), Ericaceae (6 especies) y Lamiaceae (4 especies). Las partes de las plantas más consumidas fueron: frutos (52 especies), bulbos y raíces (28 especies), hojas (22 especies), tallos (21 especies), flores e inflorescencias (19 especies), semillas (15 especies) y resinas y savia (6 especies). De las 122 especies reportadas, se identificaron 13 quelites (*Portulaca oleracea*, *Amaranthus hybridus*, *Chenopodium album*, *Dysphania ambrosioides*, *Tauschia nudicaulis*, *Begonia gracilis*, *B. sandtii*, *B. tapatia*, *Brassica nigra*, *Leucaena lanceolata*, *Oxalis corniculata*, *O. hernandezii* y *Phytolacca icosandra*), resaltando las familias Amaranthaceae, Begoniaceae y Oxalidaceae.

De las especies mencionadas por González-Elizondo *et al*. (2017) y Valenzuela-Nuñez y Briceño-Contreras (2017) en el estudio de la biodiversidad de Durango, se reconocieron diez como quelites (*Amaranthus spp*., *Begonia spp*., *Berula erecta*, *Buddleja scordioides*, *Jaltomata procumbens, Leucaena spp*., *Oxalis spp*., *Plantago major*, *Portulaca oleracea* y *Tauschia nudicaulis*).

Linares y Bye (2015) y Bye y Linares (2023) señalaron que en la cultura gastronómica Tarahumara (también conocidos como rarámuris) asentados en el estado de Chihuahua, se consumen alrededor de 120 quelites. De los cuales destacan: *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus powellii*, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus retroflexus*, *Brassica rapa*, *Anoda cristata*, *Bidens odorata*, *Bidens pilosa*, *Chenopodium berlandieri*, *Cosmos parviflorus*, *Galinsoga parviflora*, *Lepidium virginicum* y *Solanum nigrescens*. Aunque los trabajos de Linares y Bye (2015) se centran en La Sierra Tarahumara, en territorio chihuahuense, el pueblo rarámuri también se encuentra establecido en los estados de Sonora y Durango (Del Río *et al*., 2016). Los mismos autores mencionan que la vegetación cambia a lo largo de La Sierra Tarahumara debido a los gradientes ecológicos, lo cual afecta la utilización de plantas comestibles en la región. Para este análisis, se consideraron las especies mencionadas en esa investigación debido a su distribución en el estado de Durango según el Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF, 2024b).

Otros quelites con importancia a nivel nacional, que son nativos del estado de Durango según Villaseñor (2016) y que tienen una amplia distribución dentro del mismo, incluyen: el chepil (*Crotalaria pumila*) (Arrazola-Guendulay *et al*., 2018), el malacote (*Hydrocotyle ranunculoides*), la malva (*Malva parviflora*) (Castro *et al*., 2011a), la yerba mora (*Solanum americanum*) (Linares y Bye, 2015) y el chepiche (*Porophyllum linaria*) (Basurto, 2021).

Después de la revisión de la literatura, se seleccionaron un total de 39 especies de quelites pertenecientes a 15 familias botánicas. Las familias con mayor número de especies fueron Amaranthaceae, Asteraceae, Begoniaceae, Brassicaceae, Fabaceae y Solanaceae (Tabla 1). Las especies seleccionadas coinciden con las que se consumen en otras regiones y son especies ampliamente distribuidas en México, tales como la verdolaga (*Portulaca oleracea*), los quintoniles o amarantos (*Amaranthus hybridus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. palmeri*, *A. retroflexus*, *A. scariosus*, *A. crassipes* y *A. spinosus*), el epazote (*Dysphania ambrosioides*), el pápalo (*Porophyllum ruderale*), el quelite cenizo o huauzontle (*Che-*

Tabla1. Principales especies de quelites del estado de Durango.
Table 1. Main species of quelites in the state of Durango.

Familia	Especie
Amaranthaceae	*Amaranthus hybridus, Amaranthus palmeri, Amaranthus powellii, Amaranthus retroflexus, Chenopodim album, C. berlandieri, Dysphania ambrosioides*
Apiaceae	*Berula erecta, Tauschia nudicaulis*
Araliaceae	*Hydrocotyle ranunculoides*
Asteraceae	*Bidens odorata, B. pilosa, Cosmos parviflorus, Galinsoga parviflora, Porophyllum linaria, Porophyllum ruderale*
Begoniaceae	*Begonia gracilis, B. sandtii, B. tapatia*
Brassicaceae	*Brassica nigra, B. rapa, Rorippa nasturtium-aquaticum*
Fabaceae	*Crotalaria pumila, Lepidium virginicum, Leucaena lanceolata, Medicargo sativa, Zornia reticulata*
Malvaceae	*Anoda cristata, Malva parviflora*
Oxalidaceae	*Oxalis corniculata, O. hernandezii*
Phytolaccaceae	*Phytolacca icosandra*
Plantaginaceae	*Plantago major*
Polygonaceae	*Rumex crispus*
Portulacaceae	*Portulaca oleracea*
Scrophulariaceae	*Buddleja scordioides*
Solanaceae	*Jaltomata procumbens, Solanum americanum, S. nigrescens*

nopodium berlandieri), la yerba mora (*Solanum americanum*, *Solanum nigrescens*), el alache (*Anoda cristata*), el jaltomate (*Jaltomata procumbens*), la lentejilla (*Lepidium virginicum*), el amolquilite (*Phytolacca icosandra*), los chepiles (*Crotalaria incana*, *C. longirostrata* y *C. pumila*) y la lengua de vaca (*Rumex mexicanus*) (Balcázar-Quiñones *et al*., 2020; Linares y Bye, 2015).

Especies como *Amaranthus hybridus, Portulaca oleracea, Lepidium virginicum, Rorippa nasturtium-aquaticum, Solanum americanum*, entre otras, son utilizadas en comunidades de los estados de Puebla (Martínez *et al*., 2007), Oaxaca (Manzanero-Medina *et al*., 2020), Querétaro (Martínez *et al*., 2021), así como en el Estado de México (Viesca-González *et al*., 2022; Linares *et al*., 2017). En la investigación etnográfica realizada por Morales-Valenzuela *et al*. (2022) en Huitiupán, Chiapas, se identificaron ocho especies de quelites, entre ellas: *Witheringia meiantha*, *Liabum glabrum* y *Brassica juncea*. Por otro lado, en el estado de Guerrero, en el municipio de Tecoanapa, se reportaron nueve especies de quelites en el estudio de dos comunidades, incluyendo *Rytidostylis longisepala*, *Crotalaria longirostrata* y *Smilax sp*. (Flores-Sánchez *et al*., 2022). Estas dos publicaciones ponen de manifiesto la diversidad de especies de quelites que se consumen en diversas regiones de México, especies de las cuales no se tiene registro en Durango.

Según Flores-Sánchez *et al*. (2022), los recursos alimenticios están profundamente arraigados en la gastronomía territorial. En el estudio de estos autores, en el cual se compararon las tendencias de consumo en dos comunidades cercanas del estado de Guerrero, se demostró que el uso de quelites no solo depende de las especies que crecen en la zona, sino también del grado de ruralidad, las oportunidades laborales y la pobreza. En la comunidad con mayor oferta de servicios y acceso a mercados, el consumo de quelites silvestres fue menor.

La oferta de quelites en los supermercados del estado de Durango incluye pápalo, huazontle, verdolaga, hoja santa, berro, romeritos, epazote silvestre y quelite, en la Figura 1, se aprecian algunas especies que se pueden adquirir en supermercados locales. Esta variedad es menor en comparación con otros estados de México, como el Estado de México, donde la diversidad de especies y el consumo de quelites es mayor, llegando a 12 especies según Viesca-González *et al*. (2022). Entre estas especies se encuentran cenizo (*Chenopodium berlandieri*), chivatito (*Calandrinia micrantha*), corazones (*Brassica rapa*), huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*), malva (*Malva parviflora*), pápalo quelite (*Porophyllum macrocephalum*), pipicha (*Porophyllum tagetoides*) y quintonil (*Amaranthus hybridus*). Una variedad más amplia se puede comprar en los mercados de Oaxaca, como lo reporta Manzanero-Medina *et al*. (2020), en los cuales se pueden encontrar hasta 23 especies de quelites, tales como: quintoniles (*Amaranthus hybridus),* amaranto *(Amaranthus hypochondriacus),* huauzontle *(Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae),* chepiches *(Porophyllum tagetoides)*, hierba de conejo (*Tridax coronopifolia),* oreja de león *(Peperomia maculosa),* hierba santa *(Piper auritum),* entre otras. Estas diferencias se deben fundamentalmente a la importante variación en la diversidad biológica y cultural de las diferentes regiones de México.

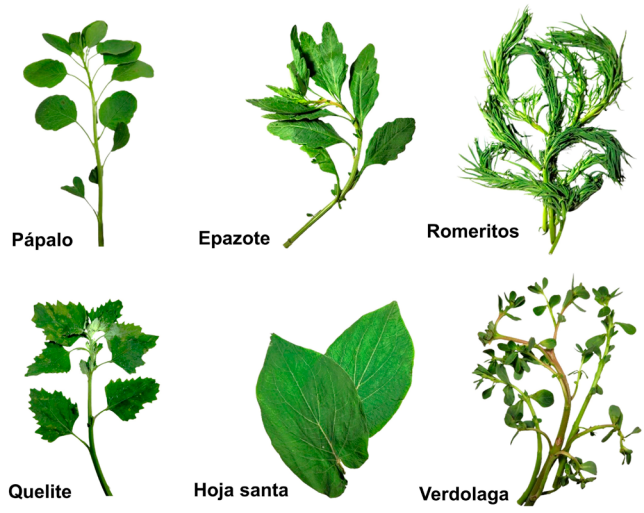


Figura 1. Algunos quelites vendidos en los supermercados del estado de Durango, México.
Figure 1. Some quelites sold in supermarkets in the state of Durango, Mexico.

Distribución

A pesar de que en todo México se consume una gran variedad de quelites y muchos de sus usos están documentados, aún existen regiones con pocos o nulos estudios publicados (Linares y Bye, 2015). En el caso de Durango, aunque hay evidencia de la presencia de diferentes especies de quelites (Figura 2), se ha reportado poco sobre su uso como alimento. Esto revela la necesidad de realizar estudios etnobotánicos en la zona.

Para abordar esta falta de información y como una aproximación, se pueden utilizar herramientas disponibles en internet, como la infraestructura de datos que proporciona el GBIF. Esta plataforma de acceso abierto ofrece datos sobre la presencia de especies distribuidas en todo el mundo (Luo *et al*., 2021). Con esta información se han generado múltiples trabajos, como lo reporta la GBIF Science Review. En 2022, se publicaron 1428 artículos revisados por pares en diferentes áreas (GBIF Secretariat, 2023). En la publicación De Melo *et al*. (2024), se demostró que con el procesamiento adecuado de datos del GBIF, se pueden identificar áreas de oportunidad en temas biodiversidad, estimar sesgos de muestreo y prever cambios de distribución de especies debido al cambio climático, tanto a niveles regionales como globales.

Para realizar el análisis de datos en esta investigación, el procesamiento de datos consistió en eliminar datos duplicados, debido a que el estudio se limitó al estado de Durango y que los registros eran relativamente pocos (1710). Después de la eliminación de registros duplicados, los datos se redujeron a 1499. No se aplicaron tratamientos adicionales.

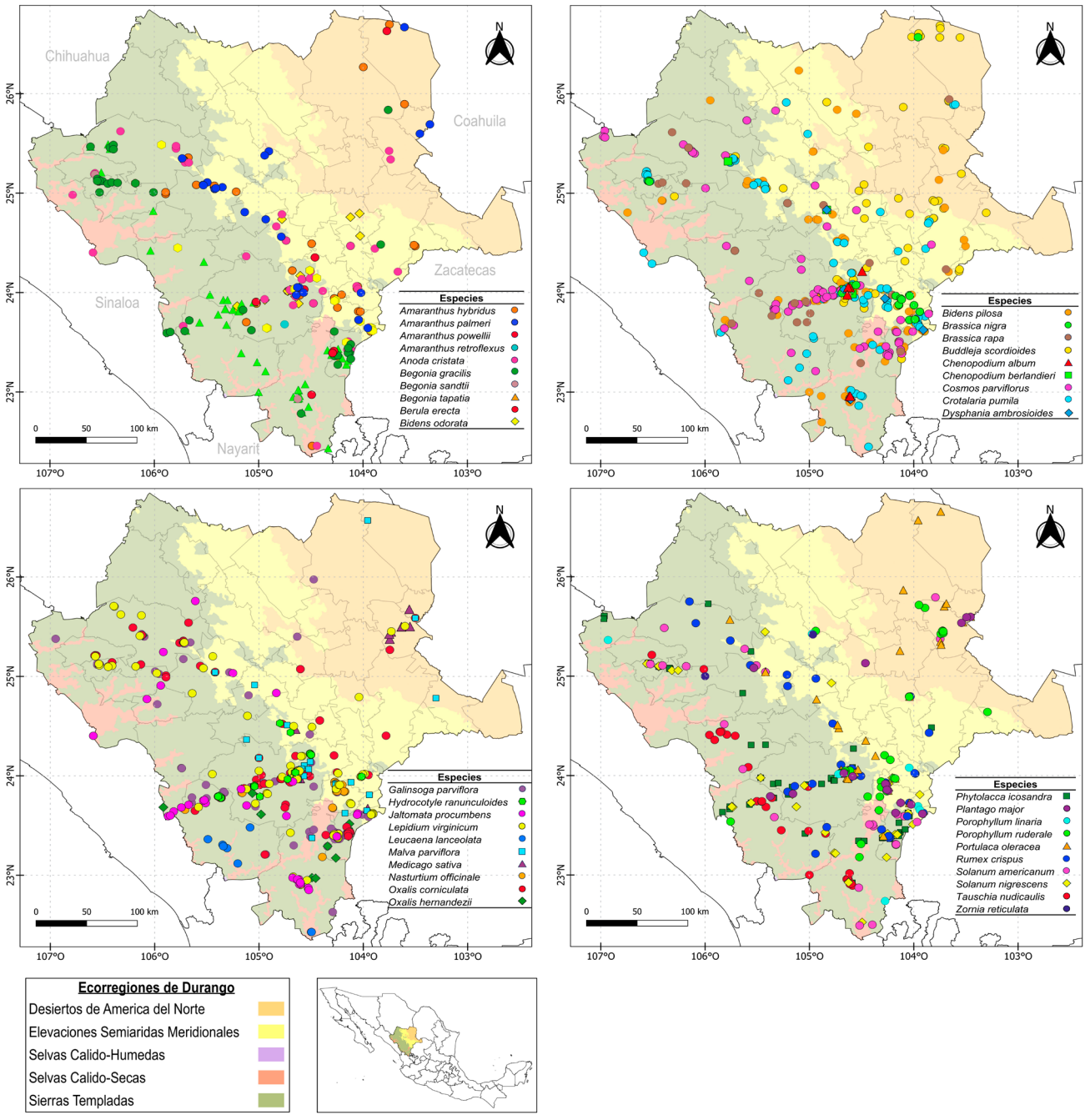


Figura 2. Distribución geográfica y hábitats de 39 quelites del estado de Durango, México. La distribución de las especies se presenta en orden alfabético. Fuente: elaboración propia en Qgis® a partir de la base de datos del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF).
Figure 2. Geographic distribution and habitats of 39 quelites from the state of Durango, Mexico. Species distribution is presented in alphabetical order. Source: own elaboration with Qgis® from the Global Biodiversity Information Facility database (GBIF).

Alrededor del teritorio mexicano, los quelites crecen a la orilla de los caminos y arroyos, en solares o en los campos de cultivo, ya sea de temporal o de riego, ligados a la milpa (maíz, frijol, calabaza, chile y otros) (Castro *et al*., 2011b; González-Jácome y Reyes-Montes, 2014; Viesca-González, *et al*., 2022). Se encuentran distribuidos prácticamente en todos los ecosistemas y agroecosistemas de México, desde los desiertos del norte, hasta las regiones tropicales del sur (Mateos-Maces *et al*., 2020).

Para el estado de Durango, la mayoría de las especies seleccionadas se concentraron en las regiones centro, noreste y sur del estado, en los municipios de Durango, Poanas, Nombre de Dios, Vicente Guerrero, Topia, Canelas, Santiago Papasquiaro, Tepehuanes y El Mezquital, como se puede observar en la Figura 2. Las especies con mayores registros a lo largo del territorio del estado fueron: *Bidens pilosa* (131 registros), *Galinsoga parviflora* (130 registros), *Crotalaria pumila* (94 registros), *Lepidium virginicum* (93 registros), *Oxalis*

corniculata (80 registros), *Buddleja scordioides* (77 registros) y *Phytolacca icosandra* (61 registros). Estas 8 especies representan el 44% de todos los registros.

La mayoría de las 39 especies de quelites mencionadas en la Tabla 1 crecen a lo largo de las sierras templadas de Durango (Figura 2). La abundancia vegetal de la Sierra Madre Occidental (SMO) está relacionada con la humedad generada por el efecto de sombra orográfica, así como con la dirección de los rayos solares, que provoca mayor tiempo de iluminación y calentamiento (González-Elizondo *et al*., 2007). La SMO tiene un gran valor económico y ambiental debido a su alta biodiversidad y su gran cantidad de especies endémicas. En esta zona, los bosques de pino-encino, albergan la más alta diversidad florística en México (González-Elizondo *et al*., 2012).

También se puede observar en las Figuras 2 y 3A, que las elvaciones semiáridas meridionales del estado de Durango albergan una diversidad importante de quelites.

Riqueza

El análisis de riqueza, usando un tamaño de celda de 0.29°, permitió dividir al estado de Durango en 165 celdas (Figura 3B), de las cuales 57 (35%) no tuvieron registro de la presencia de alguna especie de quelite. Las celdas con mayor riqueza fueron: la 13 (Canelas, Topia y Tepehuanes), la 57 (Santiago Papasquiaro), la 74, 87 y 103 (Durango), la 120 (Nombre de Dios, Poanas, Vicente Guerrero y Mezquital), la 121 (Súchil, Nombre de Dios, Mezquital y Vicente Guerrero) y la 137 (Súchil y Vicente Guerrero) (Figura 3B). Mientras que los municipios con menos riqueza de especies fueron los comprendidos por Guanaceví, San Bernardo, Ocampo, Hidalgo, San Pedro del Gallo y San Juan de Guadalupe. De todos los municipios, el de Durango fue el que tuvo el mayor número de especies de quelites (celda 87, 29 especies), es decir, el 74% de todos los quelites considerados (Figura 3A).

Con base a la revisión realizada, no se encontraron otros estudios sobre la riqueza de especies comestibles por celda definida para el estado de Durango. Sin embargo, se han elaborado mapas utilizando sistemas de información geográfica para la riqueza de familias como la Lamiaceae, para la cual, al igual que en este análisis, la mayor riqueza en el estado se concentró en la Sierra Madre Occidental (SMO) (González-Gallegos *et al*., 2022).

La riqueza de especies en las celdas ubicadas en los municipios del estado de Durango está relacionada con actividades antropogénicas, ya que la mayoría de los municipios con mayor diversidad de quelites coinciden con aquellos donde la frontera agrícola es mayor. Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2023), entre 2019 y 2021 se identificaron 835,027 hectáreas de superficie de frontera agrícola, siendo los municipios con mayor extensión Canatlán, Cuencamé, Durango, Gómez Palacio, Guadalupe Victoria, Mapimí, Nombre de Dios, Nuevo Ideal, Pánuco de Coronado, Poanas, Santa Clara y Santiago Papasquiaro. En la Figura 3A se puede observar que en las celdas que cubren municipios de Canatlán (celdas 85 y 86), Nuevo Ideal (celdas 70, 71 y 84)

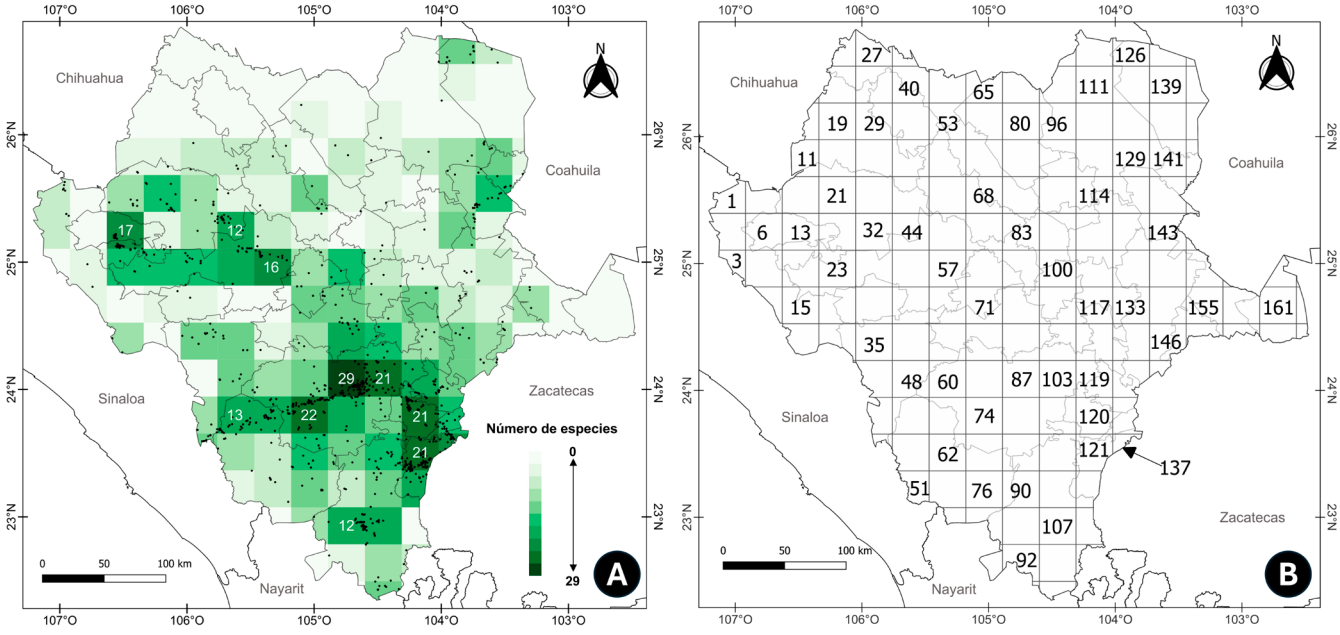


Figura 3. A: riqueza de especies de quelites por celda de (0.29 x 0.29 grados) en el estado de Durango, México. La intensidad del color indica mayor número de especies por celda, mientras que los números blancos indican el número absoluto de especies en las celdas con mayor riqueza. Los puntos negros representan la distribución de todas las especies en el estado. B: División del estado de Durango en 165 celdas. Fuente: elaboración propia en Qgis® a partir de la base de datos del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF).

Figure 3. A: species richness of quelites per cell (0.29 x 0.29 degrees) in the state of Durango, Mexico. Color intensity indicates a higher number of species per cell, while white numbers indicate the absolute number of species in the cells with higher richness. Black dots represent the distribution of all species in the state. B: Division of the state of Durango into 165 cells. Source: own elaboration with Qgis® from the Global Biodiversity Information Facility database (GBIF).

y Gómez Palacio (celdas 141 y 142), considerados por el SIAP (2023) como de importante vocación agrícola, también son zonas de riqueza relevante de especies de quelites. Los resultados aquí presentados sustentan lo reportado por Basurto (2021) acerca de que los quelites crecen asociados a los sistemas agrícolas, cuya ocurrencia se da principalmente en la agricultura tradicional. Por esta razón se ha considerado que en las zonas rurales se encuentra una mayor biodiversidad (Santiago-Saenz *et al*., 2019).

La información generada en el presente trabajo sobre la diversidad y distribución de especies de quelites puede contribuir a la diversificación de la agricultura en el estado de Durango, ya que su cultivo puede representar un ingreso debido a la alta demanda en regiones donde se conserva la tradición y el conocimiento de su consumo (Basurto, 2021). Sembrar este tipo de plantas ofrece varias ventajas en comparación con los cultivos comerciales, ya que son resistentes a la sequía, requieren un mantenimiento mínimo y no dependen de insumos externos. La comercialización masiva ha sido exitosa en algunos casos, como el pápalo y la verdolaga, lo que abre nuevas oportunidades para aprovechar especies subutilizadas. La divulgación de las características nutritivas y medicinales, así como de la baja complejidad de su cultivo, podría contribuir a la seguridad alimentaria del país (Linares y Bye, 2015).

CONCLUSIONES

Las 39 especies de quelites contempladas en este trabajo representan las especies más utilizadas en la alimentación de diversas comunidades del estado de Durango. Estas plantas no solo son una fuente de nutrientes para los consumidores, sino también un reflejo de la riqueza cultural y gastronómica de la región. A pesar de la abundancia de estas plantas a lo largo del territorio del estado de Durango, hace falta la exploración de más zonas y su relación con los grupos étnicos locales. Más estudios etnobotánicos ayudarán a documentar su uso y resaltar su valor en la dieta.

Estos estudios son fundamentales para desarrollar estrategias que revaloricen a los quelites como recursos locales con alto valor nutritivo, los cuales forman parte del patrimonio natural de México. Además, son fundamentales para promover el desarrollo económico local, desarrollando estrategias para la conservación de su germoplasma y su explotación racional.

El conocimiento de los pobladores de Durango sobre estas especies comestibles puede ayudar a contribuir a la seguridad alimentaria en el estado al incluirlas en los cultivos convencionales, esto podría garantizar su conservación y aprovechamiento sostenible en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional y al CONAHCyT por la beca otorgada a HMMG (4515568).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

Aragón-Parada, J., Carrillo-Reyes, P., Rodríguez, A. y Munguía-Lino, G. 2019. Diversidad y distribución geográfica del género *Sedum* (Crassulaceae) en la Sierra Madre del Sur, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 90: e902921. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2921

Arrazola-Guendulay, A.A., Hernández-Santiago, E. y Rodríguez-Ortiz, G. 2018. Conocimiento tradicional de plantas silvestres en una comunidad de los Valles Centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Agroecosistemas 5: 55-78.

Ávila-Uribe, M.M., García-Zárate, S.N., Sepúlveda-Barrera, A.S. y Godínez-Rodríguez, M.A. 2016. Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. Polibotánica 42: 215-245. https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.11

Balcázar-Quiñones, A., White-Olascoaga, L., Chávez-Mejía, C. y Zepeda-Gómez, C. 2020. Los quelites: riqueza de especies y conocimiento tradicional en la comunidad otomí de San Pedro Arriba, Temoaya, Estado de México. Polibotánica 48: 219-242. https://doi.org10.18387/polibotanica.49.14

Basurto, P.F. 2021. Cultivo de quelites en los valles centrales de Oaxaca, México. Etnobiología 19: 89-102.

Bye, R. y Linares, E. 2023. Ethnobotany in the sierra Tarahumara, Mexico: mountains as barriers, conduits, and generators of plant-people interactions and relationships. En A. Casas y J. J. Blancas-Vázquez (eds.). pp: 129-148. Ethnobotany of the Mountain Regions of Mexico: Ethnobotany of Mountain Regions. Springer, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77089-5_57-1

Bye, R. y Linares, E. 2011. Continuidad y aculturación de plantas alimenticias: los quelites especies subutilizadas de México. En Especies Vegetales Poco Valoradas: Una Alternativa para la Seguridad Alimentaria. O. L. M. Mera, L. D. Castro y R. Bye. (eds.). pp: 11-22. Instituto de Biología, UNAM. México, D. F.

Carrasco-Ortiz, M., Munguía-Lino, G., Castro-Castro, A., Vargas-Amado, G., Harker, M. y Rodríguez, A. 2019. Riqueza, distribución geográfica y estado de conservación del género *Dahlia* (Asteraceae) en México. Acta Botánica Mexicana 126: e1354. https://doi.org10.21829/abm126.2019.1354

Castro, L.D., Basurto, F., Mera, O.L.M. y Bye, R. 2011a. Los quelites, tradición milenaria en México. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Estado de México.

Castro, L.D., Bye, R. y Mera, O.L.M. 2011b. Diagnóstico del pápaloquelite en México, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum* (DC.) Cronq. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México.

Cedano-Maldonado, M., Villaseñor-Ibarra, L. y Haro-Luna, M.X. 2023. Wixaritari or Huichol ethnobotany of the southern Sierra Madre Occidental in Mexico. En A. Casas y J. J. Blancas-Vázquez (eds.). pp: 197-231. Ethnobotany of the Mountain Regions of Mexico: Ethnobotany of Mountain Regions. Springer, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77089-5_57-1

Chávez-Hernández, M.G. y Alvarado-Cárdenas, L.O. 2022. Taxonomía, distribución y conservación de *Funastrum* (Apocynaceae; Asclepiadoideae) en México. Botanical Sciences 100: 1073-1101. https://doi.org/10.17129/botsci.3018

De Melo, P.H.A., Bystriakova, N., Lucas, E. y Monro, A.K. 2024. A new R package to parse plant species occurrence records into unique collection events efficiently reduces data redundancy. Scientific Reports, 14, 5450. https://doi.org/10.1038/s41598-024-56158-3

Del Rio, N.D., Santana, N., Peláez-Ballestas, I., González-Chávez, S.A., Quiñonez-Flores, C.M. y Pacheco-Tena, C. 2016. Prevalence of rheumatic diseases in Raramuri people in Chihuahua, Mexico: a community-based study. Clinical Rheumatology 35: 43-52. https://doi.org/10.1007/s10067-016-3225-x

Flores-Sánchez, D., Hernández-Ruíz, A., Navarro-Garza, H., Vázquez-García, V. y Vibrans, H. 2022. Plantas silvestres en la alimentación de familias campesinas en Tecoanapa, Guerrero. Agricultura, Sociedad y Desarrollo 19: 154-167. https://doi.org10.22231/asyd.v19i2.1289

GBIF Secretariat. 2023. GBIF Science Review Nº 10. https://doi.org/10.35035/37pp-tt84

GBIF. 2024a. ¿Qué es GBIF? Disponible en: https://www.gbif.org/what-is-gbif [Consultado:11-04-2024].

GBIF. 2024b. GBIF Occurrence Download. Disponible en: https://www.gbif.org/ [Consultado:15-01-2024].

González-Elizondo, M.S., González-Elizondo, M., Márquez-Linares, M.A. 2007. Vegetación y ecorregiones de Durango. Plaza y Valdés Editores-Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

González-Elizondo, M.S., González-Elizondo, M., Tena-Flores, J.A., Ruacho-González, L. y López-Enríquez, I.L. 2012. Vegetación de la Sierra Madre Occidental, México: Una síntesis. Acta Botánica Mexicana 100: 351-403. https://doi.org/10.21829/abm100.2012.40

González-Elizondo, M., González-Elizondo, M.S., López-Enríquez, I.L., y Herrera-Arrieta, Y. 2017. Importancia económica y usos tradicionales de la flora. En A. Cruz-Angón, E. Castaños-Rochell, J. Valero-Padilla y E. Melgarejo (Coords.). pp. 533-528. La biodiversidad en Durango. Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

González-Elizondo, M., López-Enríquez, I.L., González-Elizondo, M.S., Tena-Flores, J.A. 2004. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. Instituto Politécnico Nacional. México, DF.

González-Gallegos, J.G., Castro-Castro, A., González-Elizondo, M., López-Enríquez, I.L., Ruacho-González, L. y Retana-Rentería, F.I. 2022. Riqueza y distribución de Lamiaceae en el estado de Durango, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 93: e933838. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.3838

González-Jácome, A. y Reyes-Montes, L. 2014. El conocimiento agrícola tradicional, la milpa y la alimentación: el caso del Valle de Ixtlahuaca, Estado de México. Revista de Geografía Agrícola 52-53: 21-42.

Guadarrama-Martínez, N., Rubí-Arriaga, M., Chávez-Mejía, M.C. y Thomé-Ortiz, H. 2022. Usos antrópicos de las plantas vasculares en el sureste del Estado de México. Península 17: 175-202.|

Gutiérrez-Velázquez, M.V., Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J.A., Delgado-Alvarado, E.A., González-Valdez, L.S., Torres-Ricario, R., Monreal-García, H.M. y Vasavilbazo-Saucedo, A. 2024. Effect of salinity on DNA methylation and antioxidant phenolic compounds of wild watercress (*Rorippa nasturtium aquaticum*). Plant Science Today 11: 196-205. https://doi.org/10.14719/pst.2577

Gutiérrez-Velázquez, M.V., Almaraz-Abarca, N., Herrera-Arrieta, Y., Ávila-Reyes, J.A., González-Valdez, L.S., Torres-Ricario, R., Uribe-Soto, J.N. y Monreal-García, H.M. 2018. Comparison of the phenolic contents and epigenetic and genetic variability of wild and cultivated watercress (*Rorippa nasturtium* var. *aquaticum* L.). Electronic Journal of Biotechnology 34: 9-16. https://doi.org10.1016/j.ejbt.2018.04.005

Linares, E. y Bye, R. 2015. Las especies subutilizadas de la milpa. Revista Digital Universitaria 16: 1-22.

Linares, E., Bye, R., Ortega, N. y Arce A.E. 2017. Quelites: sabores y saberes del sureste del Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. https://doi.org 10.22201/ib.9786073016667e.2019

Luo, M., Xu, Z., Hirsch, T., Aung, T.S., Xu, W., Ji, L., Qin, H. y Ma, K. 2021. The use of Global Biodiversity Information Facility (GBIF)-mediated data in publications written in Chinese. Global Ecology and Conservation 25: e01406. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01406

Manzanero-Medina, G.I., Vásquez-Dávila, M.A., Lustre-Sánchez, H. y Pérez-Herrera, A. 2020. Ethnobotany of food plants (quelites) sold in two traditional markets of Oaxaca, Mexico. South African Journal of Botany 130: 215-223. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.002

Mapes, C. y Basurto, F. 2016. Biodiversity and edible plants of Mexico. En R. Lira, A. Casas y J. Blancas (Eds.). Ethnobotany of Mexico, interactions of people and plants in Mesoamerica. Springer, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6669-7

Martínez, M.Á., Evangelista, V., Basurto, F., Mendoza, M. y Cruz-Rivas, A. 2007. Flora útil de los cafetales en la Sierra Norte de Puebla, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 78:15-40.

Martínez, P.S.S., Aguilar-Galván, F. y Hernández-Sandoval, L. 2021. Plantas silvestres comestibles de la Barreta, Querétaro, México y su papel en la cultura alimentaria local. Revista Etnobiología 19: 41-62.

Mateos-Maces, L., Chávez-Servia, J.L., Vera-Guzmán, A.M., Aquino-Bolaños, E.N., Alba-Jiménez, J.E. y Villagómez-González, B.B. 2020. Edible leafy plants from Mexico as sources of antioxidant compounds, and their nutritional, nutraceutical and antimicrobial potential: A review. Antioxidants 9: 541. https://doi.org10.3390/antiox9060541

Medrano-Guerrero, A., Carranza, E., Juárez-Vázquez, M.D.C., Solano, E., Ruiz-Padilla, A.J., Ruiz-Noa, Y., Deveze-Alvarez, M.A., Brennan-Bourdon, L.M. y Alonso-Castro, A.J. 2023. Medicinal plants used in rural communities from the municipality of Dolores Hidalgo, Guanajuato, Mexico. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 22: 524-536. https://doi.org10.37360/blacpma.23.22.4.39

Morales-Valenzuela, G., Hernández-López, D.M. y Padilla-Vega, J. 2022. Diversity, abundance, and uses of vegetables in milpas within a Tsotsil community of Huitiupán, Chiapas. Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical 2: 5-16. https://doi.org10.5154/r.rchsagt.2021.03.01

Narváez-Elizondo, R.E. 2020. Las plantas silvestres también se comen: un patrimonio biocultural por rescatar. Árido-Ciencia 5: 2-21.

Narváez-Elizondo, R.E., González-Elizondo, M., González-Elizondo, M.S., Tena-Flores, J.A. y Castro-Castro A. 2020. Edible ethnoflora of the southern tepehuans of Durango, Mexico. Polibotánica 50: 245-277. https://doi.org10.18387/polibotanica.50.15

Pacheco-Hernández, Y., Lozoya-Gloria, E., Becerra-Martínez, E. y Villa-Ruano, N. 2022. Nutraceutical potential of seven "quelites" harvested in the northern highlands of Puebla-México. Horticulturae 9: 2-17. https://doi.org10.3390/horticulturae9010018

Pascual-Mendoza, S., Saynes-Vásquez, A., Pérez-Herrera, A., Meneses, M.E., Coutiño-Hernández, D. y Sánchez-Medina, M.A. 2023. Nutritional composition and bioactive compounds of quelites consumed by indigenous communities in the Municipality of Juquila Vijanos, sierra norte of Oaxaca, Mexico. Plant Foods for Human Nutrition 78: 193-200. https://doi.org/10.1007/s11130-022-01039-1

QGIS Development Team. 2023. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://qgis. osgeo.org

Román-Cortés, N.R., García-Mateos, M.D.R., Castillo-González, A.M., Sahagún-Castellanos, J. y Jiménez-Arellanes, M.A. 2018. Características nutricionales y nutracéuticas de hortalizas de uso ancestral en México. Revista Fitotecnia Mexicana 41: 245-25. https://doi.org10.35196/rfm.2018.3.245-253

Sandoval-Ortega, M.H., De Loera-Ávila, E.E.D., Martínez-Calderón, V.M. y Zumaya-Mendoza, S.G. 2023. Plantas silvestres comestibles del estado de Aguascalientes, México, sus formas de consumo y comercialización. Polibotánica 55: 213-230. https://doi.org10.18387/polibotanica.55.14

Santiago-Saenz, Y.O., Hernández-Fuentes, A.D., López-Palestina, C.U., Garrido-Cauich, J.H., Alatorre-Cruz, J.M. y Monroy-Torres, R. 2019. Importancia nutricional y actividad biológica de los compuestos bioactivos de quelites consumidos en México. Revista Chilena de Nutrición 46: 593-605. https://doi.org10.4067/S0717-75182019000500593

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2023. Panorama de la frontera agrícola de México por Representación Estatal SADER 2022. Disponible en: https://www.gob.mx/siap/documentos/panorama-de-la-frontera-agricola-de-mexico-por-representacion-estatal-sader-295448 [Consultado: 30-05-2024].

Valenzuela-Núñez, L.M. y Briceño-Contreras E.A. 2017. Uso de hongos, flora y fauna silvestre. En A. Cruz-Angón, E. Castaños-Rochell, J. Valero-Padilla y E. Melgarejo (Coords.). pp. 503-507. La biodiversidad en Durango. Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Viesca-González, F.C., Alvarado-Carrillo, D.D.J. y Quintero-Salazar, B. 2022. Los quelites en la ciudad de Toluca, México: su recolección, comercialización y consumo. Estudios sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional 32: e221158. https://doi.org10.24836/es.v32i59.1158

Villaseñor, J.L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad 87: 559-902. https://doi.org10.1016/j.rmb.2016.06.017

Villaseñor, J.L., Ortiz, E. y Sánchez-González A. 2022. Riqueza y distribución de la flora vascular del estado de Hidalgo, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 93: e933920. https://doi.org10.22201/ib.20078706e.2022.93.3920

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Prosthechea karwinskii leaves extract with potential for the treatment of atherothrombosis

Extracto de hojas de Prosthechea karwinskii con potencial para el tratamiento de la aterotrombosis

Gabriela Soledad Barragán Zarate[1], Luicita Lagunez Rivera[1]*, Rodolfo Solano[1], Jesús Hernández Juárez[1], Abimael López Pérez[1] and Candy Carranza Álvarez[2]

[1] Laboratorio de Extracción y Análisis de Productos Naturales Vegetales, Centro Interdisciplinario de In-vestigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional, Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, 71230, Oaxaca, México.

[2] Unidad Académica Multidisciplinaria de la Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Romualdo del Campo 501, Frac. Rafael Curiel, C.P. 79060, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México.

ABSTRACT

Prosthechea karwinskii is an orchid endemic to southern Mexico used in traditional medicine. It has anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective activity. Given the relationship between inflammation, oxidative stress, and coagulation in the development of atherothrombosis, the objective of this research was to evaluate the potential of *P. karwinskii* leaves extract as a possible alternative to reduce the risk of atherothrombosis. The compounds of the extract were identified by UHPLC-ESI-qTOF-MS. The content of total phenols and flavonoids was measured, as well as its antioxidant capacity (DPPH and DCFH-DA essays) and its effect on clotting times. The results showed the presence of phenolic and flavonoid compounds in the extract, as well as their antioxidant capacity. In addition, the extract prolonged clotting times, mainly thrombin, and activated partial thromboplastin times, i.e., it inhibited the intrinsic pathway of hemostasis and the conversion of fibrinogen to fibrin. These results and the background of the extract show its potential as a treatment to reduce atherothrombotic risk, as well as for other diseases whose pathogenesis involves oxidative stress and coagulation.

***Keywords*:** anticoagulant, cellular antioxidant, reactive oxygen species.

RESUMEN:

Prosthechea karwinskii es una orquídea endémica del sureste de México empleada en la medicina tradicional, presenta actividad antiinflamatoria, antioxidante y cardioprotección. Dada la relación que existe entre la inflamación, el estrés oxidativo y la coagulación en el desarrollo de aterotrombosis, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial del extracto de hojas de *P. karwinskii* como posible alternativa para disminuir el riesgo de aterotrombosis. Se identificaron los compuestos del extracto por UHPLC-ESI-qTOF-MS, se midió el contenido de fenoles y flavonoides totales, su capacidad antioxidante (ensayos DPPH y DCFH-DA) y su efecto en los tiempos de coagulación. Los resultados mostraron la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto, así como su capacidad antioxidante. Además, el extracto prolongó los tiempos de coagulación, principalmente los tiempos de trombina y de tromboplastina parcial activada, es decir, inhibió la vía intrínseca de la hemostasia y la conversión del fibrinógeno en fibrina. Estos resultados y los antecedentes del extracto muestran su potencial como tratamiento para reducir el riesgo aterotrombótico, así como para otras enfermedades cuya patogénesis involucre al estrés oxidativo y la coagulación.

***Palabras clave*:** anticoagulante, antioxidante celular, especies reactivas del oxígeno.

INTRODUCTION

Thrombosis is the obstruction of blood vessels by the formation of a thrombus. It has become a worldwide health problem, being responsible for 1 in 4 deaths in humans (Yin *et al*., 2023). Atherothrombosis is the formation of a thrombus due to atherosclerosis. The site where atherosclerotic lesions develop is the vascular subendothelium, which maintains the activity of procoagulant, anticoagulant, and fibrinolytic factors in equilibrium, preventing clot formation at all times when they are not required. However, when the endothelium is dysfunctional, due to factors such as oxidative stress and inflammation, the balance is lost, giving way to the formation of atheroma plaques and pathological clots (thrombi) that occlude the vascular lumen. Therefore, it is crucial to maintain a healthy endothelium and rapidly restore its normal function to decrease the atherothrombotic risk (Nguyen *et al*., 2023).

The development of atheroma plaques is accelerated by inflammation. Inflammatory cell recruitment is accompanied by the production of proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF-α), and C-reactive protein (CRP), among others, which in turn promote further inflammatory cell recruitment and stimulate differentiation of monocytes into macrophages and foam cells at atherosclerotic sites (Chan *et al*., 2022).

The drugs currently used for the treatment of atherothrombotic disease include, among others, anticoagulants

*Author for correspondence: Luicita Lagunez Rivera
e-mail: llagunez@ipn.mx
Received: June 18, 2024
Accepted: October 31, 2024
Published: December 6, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2378

and/or antiplatelet agents; however, they are not totally effective and safe, and in some cases, they are difficult to manage, with bleeding being their main complication. For this and other reasons, the discovery of new agents with antithrombotic potential continues to be important (Nguyen *et al*., 2023). Antioxidant compounds have the potential to reduce atherothrombotic risk by preventing endothelial dysfunction, and by acting as anticoagulants and antiplatelet agents. In addition, they may have beneficial effects at the vascular level by scavenging lipid peroxides and free radicals that impair vascular endothelium (Le *et al*., 2022). Because of the key role of inflammation in atherosclerosis and atherothrombosis, anti-inflammatory agents can also be considered as potential treatments for these conditions (Chan *et al*., 2022).

Prosthechea karwinskii (Mart.) J.M.H. Shaw is an orchid endemic to southeastern Mexico. It is important in the Mixtec region of the Oaxaca State due to its ornamental, ceremonial, and medicinal uses. The different parts of this orchid are used to treat diabetes, wounds and burns, cough, threatened abortion, or assist in labor (Cruz-García *et al*., 2014), all these related to inflammatory processes (Barragán-Zarate *et al*., 2022).

Leaves are part of the plant with the highest amount of total phenols and flavonoids, as well as the highest antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo*, through ROS inhibition (Barragán-Zarate *et al*., 2022). *P. karwinskii* leaves extract obtained with ultrasound can inhibit ROS, as well as anti-inflammatory effect in models of acute inflammation induced with carrageenan (Barragán-Zarate *et al*., 2020) and chronic inflammation by decreasing TNF-α and CRP in a model of metabolic syndrome (Barragán-Zarate *et al*., 2021), both with Wistar rats. In addition, it is considered to provide cardiovascular protection (Lagunez-Rivera *et al*., 2023).

This study aimed to evaluate the potential use of *P. karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids, to decrease the atherothrombotic risk through its ability to inhibit ROS and prolong clotting times.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

RPMI-1640 reagent, 2′,7′ Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid, acetonitrile, ethanol, phosphate-buffered saline (PBS), hydrogen peroxide (H_2O_2), trypan blue solution, DPPH, aluminum trichloride, Folin Deniss reagent, distilled water, methanol, acetonitrile, and formic acid, were purchased from Sigma Aldrich (Toluca, Mexico). The reagents for the coagulation assays: CK prest-2, Neoplastine CI+2, STa Thrombin, STA $CaCl_2$, STA System control N+P, and STA Owren-Koller were from Stago (Asnieres, France).

Plant material

Prosthechea karwinskii orchids were collected from the altar decorations of the churches after the Holy Week celebrations in Zaachila, Oaxaca, in April 2018. A specimen voucher was deposited in the OAX Herbarium of the Instituto Politécnico Nacional (Solano 4037). For this research, only the leaves of the plant were used, which were ground and sieved for the extraction of its compounds.

Obtaining the extract

The subcritical fluid-assisted extraction was performed in a high-pressure reactor (RAP-100 SEV-PRENDO) with agitation and a high-pressure HPLC pump (EX1600 PUMP Exformma Technologies). Ten g of sample were taken and 50 % ethanol in water was used as a solvent, with a sample: solvent ratio of 1:18 (18 mL of solvent is added for each gram of sample), a pressure of 50 bar and a temperature of 100 °C, for 20 min. Once the extract was obtained, it was kept frozen until analysis for preservation.

Compound identification with UHPLC-ESI-qTOF-MS

A UHPLC system (Thermo Scientific, Ultimate 3000) coupled to electrospray ionization (ESI) source to a and time-of-flight (TOF) mass spectrometer was used. The column used was an ODS Hypersil (125x4 mm, with a particle size of 3 µm). The mobile phases were A: 0.1 % formic acid in water and B: acetonitrile. The gradient system was 0 % B (0-2 min), 3 % B (2-3 min), 8 % B (3-4 min), 30 % B (4-6 min), 35 % B (6-7 min), 40 % B (7-8 min), 50 % B (8-9 min), 80 % B (9-10 min), 0 % B (10-11.5 min), 0 % B (11.5-14 min). The injection temperature was 25 °C with a flow rate of 200 µL/min. The mass spectrometer was operated in positive mode in the mass range of 50-1500 m/z. Capillary voltage ionization was 2700 V. Tentative identification was performed by comparing the m/z value with Compound Crawler and information reported in articles.

Total phenol content

The total phenol content was determined using the procedure described by Swain and Hillis (1959). For this purpose, 0.5 mL of the extract diluted to a concentration of 5 mg/mL was mixed with 4 mL of water and 0.25 mL of Folin-Denis reagent for 4 min, and then 1 mL of 1 N sodium carbonate solution was added. The mixture was allowed to stand for 2 h at room temperature, and the absorbance was determined at 760 nm in a spectrophotometer (Zeigen 1104). Gallic acid was used as a reference standard, and the results were expressed as mg gallic acid equivalent per g sample (mg GAE/g). Analyses were performed in triplicate.

Total flavonoid content

The total flavonoid content was determined according to the methodology of Chang *et al*. (2002). The extract diluted to a concentration of 5 mg/mL was taken in 0.5 mL, mixed with 1.5 mL of 95 % ethanol, 0.1 mL of 10 % aluminum trichloride ($AlCl_3$), 0.1 mL of 1 M potassium acetate (CH_3COOK) and 2.8 mL of distilled water. The mixture was left to react for 30 minutes at room temperature, and the absorbance was read at 415 nm in a spectrophotometer (Zeigen 1104). Quercetin was used as a reference standard. Results were expressed as mg quercetin equivalents per g sample (mg QueE/g). Analyses were performed in triplicate.

In vitro antioxidant capacity

The *in vitro* antioxidant activity of the extracts was determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. According to the method described by Scherer and Godoy (2009), a solution of 100 µM DPPH in methanol and the extract at different concentrations were prepared. The reaction time was 90 min in the dark at room temperature. Readings were taken at a wavelength of 517 nm in the spectrophotometer (Zeigen 1104). Analyses were performed in triplicate and expressed as % inhibition concerning the negative control (DPPH with methanol without extract). Ascorbic acid was used as a reference.

Biological evaluation in blood samples from healthy volunteers

The protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of the Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, with registration number 24PV009FO. Volunteers gave their informed consent. They were between 18 and 45 years old, of medium build, and were considered healthy as they presented blood chemistry parameters within normal ranges.

Cellular antioxidant capacity through ROS inhibition in peripheral blood mononuclear cells

The DCFH-DA assay was used to measure the inhibition of ROS in cells. This reagent is deacetylated to a non-fluorescent compound in cells, which in turn is oxidized by ROS to form the fluorescent compound 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF), whose fluorescence is directly proportional to the content of ROS in cells (Torres-Rodríguez *et al*., 2016). The methodology used by Barragán-Zarate *et al*. (2020) was followed, where peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers were used. Concentrations of 10, 100, 250, 250, 500, and 1000 µg/mL of 0.1 % DMSO extract were evaluated. Readings were performed on a spectrophotometer with DTX 800 multi-mode detector (Beckman Coulter) at 520 nm for emission and 485 nm for excitation. The results were expressed as % inhibition of ROS concerning the control (to which no extract was added).

Anticoagulant activity

Coagulation times were measured to evaluate the effect of *P. karwinskii* extract on the activity of plasma hemostasis factors, following the methodology of López-Pérez *et al*. (2022). For this purpose, platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the blood of healthy volunteers (a pool obtained from ten men and ten women). Samples were collected in tubes with sodium citrate as an anticoagulant (3.2 %), maintaining a blood-anticoagulant ratio of 9:1. The PPP was obtained after centrifuging the blood at 2,500 x g for 15 min. Prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and activated partial thromboplastin time (aPTT) were evaluated following the methodologies of the Stago brand commercial reagents (Neoplasntine CI+2, CK prest-2, and STA Thrombin) in a STart® 4 equipment (Stago, Asnieres, France) with minor modifications to evaluate *P. karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluid at concentrations of 1, 5, 10 and 20 mg/mL (mg extract/mL Owren Koller buffer).

Statistical analysis

The results were presented as the mean ± standard deviation. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test to compare means. Statistical analyses were performed with Graph Pad 5.0 software. A statistically significant difference was considered when the value of $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Compound identification with UHPLC-ESI-qTOF-MS

Figure 1 shows the chromatogram of the leaves extract of *P. karwinskii* obtained with subcritical fluids (LEPKSU). Table 1 shows the information corresponding to the peaks of the chromatogram, which belong to the compounds present in the extract, as well as their tentative identification. A total of 16 compounds were found. The major compounds identified were: 1-O-4-Morpholinyl-d-fructose, quinic acid, adenosine, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, taxifolin, and histopine.

Although the UHPLC-ESI-qTOF-MS analysis performed for the extract obtained with ultrasound (Barragán-Zarate *et al*., 2021) using negative ionization, unlike the extract of the present study obtained with subcritical fluids that was analyzed with positive ionization, compounds with pronounced peaks and important biological activity (quinic acid, rutin and kaempferol-3-O-rutinoside) were identified in both extracts.

Phenol content, total flavonoids and *in vitro* antioxidant capacity

Table 2 shows the phenol and total flavonoid content and *in vitro* antioxidant capacity of the extract. The flavonoids identified with UHPLC-ESI-qTOF-MS were rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, taxifolin, and apigenin 4′-O-β-D-glucopyranoside. Polyphenols can exert antithrombotic effects by inhibiting platelet aggregation and ameliorate endothelial dysfunction associated with various risk factors for atherosclerosis before plaque formation (Pandey and Rizvi, 2009). Flavonoids are

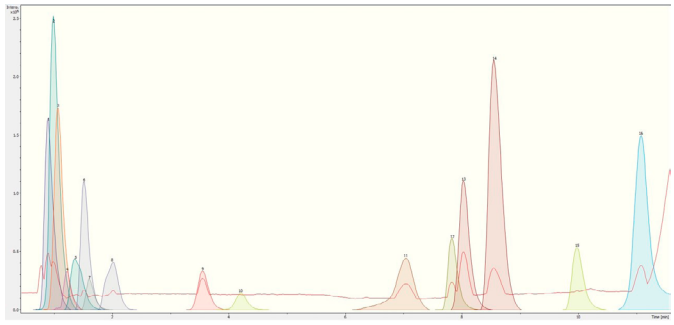


Figura 1. Cromatograma con UHPLC-ESI-qTOF-MS del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* obtenido con fluidos subcríticos.
Figure 1. UHPLC-ESI-qTOF-MS chromatogram of *Prosthechea karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids.

Tabla 1. Información de los compuestos identificados con UHPLC-ESI-qTOF-MS del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* obtenido con fluidos subcríticos.
Table 1. Information on compounds identified with UHPLC-ESI-qTOF-MS of *Prosthechea karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids.

PN	RT	m/z [M+1]	Error	msigma	Suggested formula	Compound name	Reference
1	0.9	104.1063	0.4	1.2	$C_5H_{13}NO$	Not identified	e
2	1.0	266.1235	0.4	0.8	$(C_{10}H_{19}NO_7)$	1-O-4-Morpholinyl-d-fructose	e
3	1.0	193.0697	0.3	0.9	$(C_7H_{12}O_6)$	Quinic acid	d
4	1.2	118.0856	3.1	1.5	$(C_4H_6O_4)$	Succinic acid	d
5	1.3	280.1386	0.1	2.6	$(C_{11}H_{21}NO_7)$	3-0-L-Valil-d-glucopyranose	e
6	1.5	210.0598	0.1	1.7	$(C_6H_{11}NO_7)$	2,0-aminohexuronic acid	e
7	1.6	130.0497	0.1	1.6	$(C_5H_8NO_3)$	Not identified	e
8	2.0	132.1011	- 0.8	0.3	$(C_6H_{13}NO_2)$	Aminocaproic acid	e
9	3.6	268.1025	- 1.0	5.1	$(C_{10}H_{13}N_5O_4)$	Adenosine	e
10	4.2	166.0864	- 2.4	2.1	$(C_9H_{11}NO_2)$	L-Phenylalanine	d
11	7.0	227.1744	- 0.3	3.4	$(C_{12}H_{22}N_2O_2)$	Not identified	e
12	7.8	611.1586	0.2	3.6	$(C_{27}H_{30}O_{16})$	Rutin	bd
13	8.0	595.1636	- 0.5	1.2	$(C_{27}H_{30}O_{15})$	Kaempferol-3-O-rutinoside	bd
14	8.5	305.0984	- 2.6	2.3	$(C_{15}H_{12}O_7)$	Taxifolin	a
15	9.9	433.1478	- 2.0	3.3	$(C_{21}H_{20}O_{10})$	Apigenin 4′-O-β-D-glucopyranoside	a
16	11.1	228.1943	- 2.5	2.0	$(C_9H_{14}N_3O_4)$	Histopine	c

PN: Peak Number, RT: Retention Time. [a]Tang *et al*. (2024), [b]Avula *et al*. (2022), [c]Padilla *et al*., (2021), [d]Compounds previously reported by Barragan-Zarate *et al*. (2021) for the leaf extract obtained with ultrasound, [e]Compound formula suggested by CompoundCrawler.

Tabla 2. Capacidad antioxidante *in vitro* y contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* obtenido con fluidos subcríticos.
Table 2. *In vitro* antioxidant capacity and total phenol and flavonoid content of *Prosthechea karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids.

Evaluation	
DPPH	**% inhibition**
Extract (mg/mL)	
0.5	5.541 ± 0.396
1.0	11.400 ± 0.762
2.0	24.192 ± 0.285
3.0	34.294 ± 0.540
4.0	44.237 ± 0.503
5.0	53.580 ± 1.890
Ascorbic acid (2 mg/mL)	49.071 ± 2.940
	mg GAE/g
Total phenols	73.318 ± 8.037
	mg QueE/g
Total Flavonoids	3.421 ± 0.020

mg GAE/g: mg gallic acid equivalent per g of sample; mg QueE/g: mg quercetin equivalent per g of sample; DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl. Results are shown as the mean ± standard deviation.

employed in the clinical treatment of vascular disorders as they prevent capillary permeability, act as phlebotonics and improve blood rheology, although their mechanism of action remains partially unknown (Zaragozá *et al*., 2021). Flavonoids also exhibit anti-inflammatory activity, which is closely related to platelet aggregation through arachidonic acid and can inhibit thrombin generation (Leite *et al*., 2023). In addition, being anti-inflammatory, they could stop the formation of atheroma plaques by restricting the recruitment of proinflammatory cells and the production of inflammatory markers (Chan *et al*., 2022). Thus, the presence of this type of compounds in LEPKSU contributes to its potential to reduce atherothrombotic risk.

Figure 2 shows the ability of LEPKSU to inhibit ROS at different concentrations; it was observed that as the concentration of the extract increases, its ability to inhibit ROS increases. Unlike *in vitro* studies, antioxidant activity models in cells address some problems of absorption, distribution, and metabolism of the compounds evaluated (Wolfe *et al*., 2007), since they are taken to physiological pH and temperature conditions, giving us a closer overview of what happens to the compounds when administered to a living system, hence, they are more representative from the biological point of view (Shen *et al*., 2019).

Atherothrombosis can be triggered by a dysfunctional or damaged endothelium, resulting in exposure of suben-

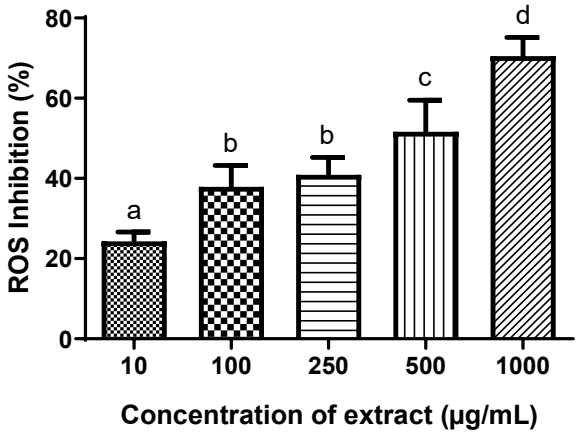


Figura 2. Inhibición de especies reactivas del oxígeno del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* obtenido con fluidos subcríticos. Valores expresados como media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa (P < 0.05).
Figure 2. Inhibition of reactive oxygen species of *Prosthechea karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids. Values are expressed as mean ± standard deviation. Different superscripts indicate a significant difference (P < 0.05).

dothelial plaque tissue to the bloodstream (Mastenbroek *et al*., 2015). When vascular endothelial cells are damaged, their structure and function are altered, activating procoagulant substances to activate platelets and contribute to thrombus formation. Damaged endothelium is accompanied by an inflammatory response and oxidative stress, which generates large amounts of ROS that aggravate the damage, making thrombus formation and development more likely (Wang *et al*., 2023). LEPKSU can inhibit ROS in cells, so it could decrease atherothrombotic risk by preventing aggravation of endothelial damage and thrombus development.

Of the compounds identified in the extract, those with antioxidant activity include rutin (Yeh *et al*., 2014) and kaempferol-3-O-rutinoside (Wang *et al*., 2015), which increase the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GSH-Px, and reduced GSH levels, in addition to taxifolin, which decreases malondialdehyde levels and increases total GSH levels (Bedir *et al*., 2021). These compounds may be responsible for the ability of the extract to inhibit ROS. Regarding the ROS inhibition of LEPKSU in comparison with the extract obtained with ultrasound by Barragan Zarate *et al*. (2020), a similar ROS inhibition of both extracts was observed at the 1000 mg/mL concentration; however, there were differences at the other concentrations evaluated.

Anticoagulant activity

Figure 3 shows the effect of LEPKSU on clotting times. Although a prolongation of all three clotting times was observed, the effect was greater in TT and aPTT, where these times were tripled at the 20 mg/mL concentration compared to where no extract was added. As for PT, the extract prolonged clotting time significantly (p > 0.05) only at the 20 mg/mL concentration.

The plasma phase of hemostasis comprises three stages: initiation, amplification and propagation. The study of these phases in the laboratory is based on the 1964 model of coagulation, in which fibrin formation depends on two activation pathways, the intrinsic and the extrinsic, in addition to a common one in which both pathways converge. With PT, the activity of the factors of the extrinsic pathway is evaluated, and with aPTT, the activity of the factors of the intrinsic pathway. Prolongation of one or both clotting times is indicative of a factor deficiency or the presence of an inhibitor that slows clotting (Edziri *et al*., 2020; Le *et al*., 2022). The TT represents the time it takes for fibrinogen to be converted to fibrin by addition of exogenous thrombin; a prolonged TT indicates an anticoagulant effect, while a shorter TT indicates a procoagulant effect. Platelet aggregation, as well as increased coagulation factor activity and thrombin generation induce thrombus formation and growth (Wang *et al*., 2023). The results suggest that the anticoagulant activity of the extract is given by inhibition of one or more plasma factors of the intrinsic pathway of hemostasis, or that the prolongation of aPTT is a secondary effect of thrombin inhibition by the extract.

The intrinsic coagulation pathway is triggered by contact of FXII (coagulation factor XII) with negatively charged surfaces. It has been shown that fibrillar collagen, such as that present in atherosclerotic plaques, can bind to FXII and promote its activation. Like thrombin, activated FXII activa-

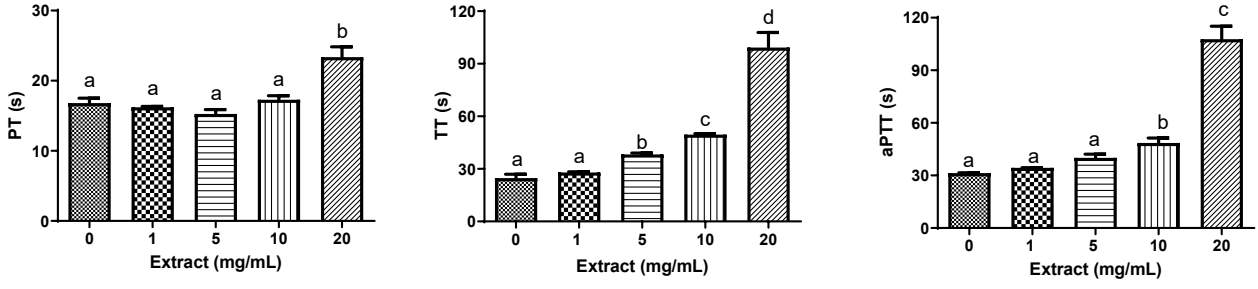


Figura 3. Tiempos de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de trombina (TT) y tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) del extracto de hojas de *Prosthechea karwinskii* obtenido con fluidos subcríticos. Valores expresados como media ± desviación estándar. Superíndices distintos indican diferencia significativa (P < 0.05).
Figure 3. Coagulation times: prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and activated partial thromboplastin time (aPTT) of *Prosthechea karwinskii* leaves extract obtained with subcritical fluids. Values are expressed as mean ± standard deviation. Different superscripts indicate a significant difference (P < 0.05).

tes FXI, which in turn activates FIX. Given the role of the FXII pathway in atherothrombosis, but not in hemostasis, the intrinsic coagulation pathway may be an attractive target for antithrombotic drugs with low bleeding risk (Mastenbroek *et al*., 2015). Thrombin and factor Xa contribute to atherogenesis up to the point of atherothrombosis. These are not only limited to thrombus formation in unstable plaques, but play an important role in the initial development of atherosclerosis. Activation of coagulation and thrombin generation not only promote fibrin production and platelet activation, but are involved in atherogenesis (Olie *et al*., 2018).

The effect of LEPKSU in prolonging the common and intrinsic coagulation pathways, in addition to its possible inhibition of thrombin, suggests that LEPKSU has the potential to limit or slow the progression of atherogenesis to atherothrombosis. Compounds present in the extract with anticoagulant or antithrombotic activity are rutin and quinic acid. Rutin may be an antithrombotic agent due to its ability to prolong aPTT and PT, in addition to decreasing thrombin activity and inhibiting platelet aggregation (Choi *et al*., 2015). Rutin acts by blocking Glycoprotein IIb/IIIa receptors (Zaragozá *et al*., 2021), thus inhibiting platelet aggregation. Quinic acid has also shown an antithrombotic effect in a zebrafish model of thrombosis, possibly targeting the arachidonic acid pathway (Shi *et al*., 2020).

Compounds that present biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antiplatelet aggregation and anticoagulant may contribute to prevent thrombotic disorders (Leite *et al*., 2023). According to the results of the present investigation, LEPKSU presents cellular antioxidant activity by inhibiting ROS, as well as anticoagulant activity, in addition, there is the antecedent of anti-inflammatory activity of *P. karwinskii* leaf extract obtained with ultrasound (Barragán-Zarate *et al*., 2020; Barragán-Zarate *et al*., 2021) and provides cardiovascular protection (Lagunez-Rivera *et al*., 2023). All this supports the potential of LEPKSU to decrease the risk of atherothrombosis.

CONCLUSIONS

The extract showed dose-dependent anticoagulant activity since it prolonged the TT and aPTT. The background of biological activity of the identified compounds in the extract and the anti-inflammatory activity of the plant, as well as the results of the present study on the phenols and flavonoids contents, the ability of the extract to inhibit ROS in mononuclear cells, and its ability to prolong the common and intrinsic pathways of coagulation, show us the potential of the extract as an alternative therapy to reduce atherothrombotic risk, as well as other conditions in whose pathogenesis oxidative stress and blood coagulation are involved.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, project 270428 and postdoctoral fellowship with 392827) and the Instituto Politécnico Nacional (IPN, projects SIP 2016-RE/50, SIP-20161270, SIP-0170263, SIP-20180382, SIP-20180451, SIP-20240944). To the Organizing Committee of the Holy Week celebrations in Villa de Zaachila (Oaxaca, Mexico) for facilitating the recovery of specimens from the churches.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Avula, B., Katragunta, K., Wang, Y.H., Ali, Z., Srivedavyasasri, R., Gafner, S., Slimestad, R. and Khan, I.A. 2022. Chemical profiling and UHPLC-QToF analysis for the simultaneous determination of anthocyanins and flavonoids in Sambucus berries and authentication and detection of adulteration in elderberry dietary supplements using UHPLC-PDA-MS. Journal of Food Composition and Analysis 110, 104584. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104584

Barragán-Zarate, G.S., Alexander-Aguilera, A., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Soto-Rodríguez, I. 2021. Bioactive compounds from *Prosthechea karwinskii* decrease obesity, insulin resistance, pro-inflammatory status, and cardiovascular risk in Wistar rats with metabolic syndrome. Journal of Ethnopharmacology 279, 114376. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114376

Barragán-Zarate, G.S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D.M. and Vilarem, G. 2022. Validation of the traditional medicinal use of a Mexican endemic orchid (*Prosthechea karwinskii*) through UPLC-ESI-qTOF-MS/MS characterization of its bioactive compounds. Heliyon 8(7), e09867. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09867

Barragán-Zarate, G.S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Pineda-Peña, E.A., Landa-Juárez, A.Y., Chávez-Piña, A.E., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D.M. 2020. *Prosthechea karwinskii*, an orchid used as traditional medicine, exerts anti-inflammatory activity and inhibits ROS. Journal of Ethnopharmacology 253, 112632. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112632

Bedir, F., Kocatürk, H., Yapanoğlu, T., Gürsul, C., Arslan, R., Mammadov, R., Çoban, A., Altuner, D. and Suleyman, H. 2021. Protective effect of taxifolin against prooxidant and proinflammatory kidney damage associated with acrylamide in rats. Biomedicine and Pharmacotherapy 139. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111660

Chan, N.C., Xu, K., de Vries, T.A.C., Eikelboom, J.W. and Hirsh, J. 2022. Inflammation as a mechanism and therapeutic target in peripheral artery disease. Canadian Journal of Cardiology 38, 588-600. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2022.01.026

Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 176-182.

Choi, J.H., Kim, D.W., Park, S.E., Lee, H.J., Kim, K.M., Kim, K.J., Kim, M.K., Kim, S.J. and Kim, S. 2015. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. Journal of Bioscience and Bioengineering 120, 181-186. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.012

Cruz-Garcia, G., Solano-Gomez, R. and Lagunez-Rivera, L. 2014. Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. Revista Brasileira de Farmacognosia 24, 153-158. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.002

Edziri, H., Guerrab, M., Anthonissen, R., Mastouri, M. and Verschaeve, L. 2020. Phytochemical screening, antioxidant, anticoagulant and in vitro toxic and genotoxic properties of aerial parts extracts of *Fumaria officinalis* L. growing in Tunisia. South African Journal of Botany 130, 268-273. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.014

Lagunez-Rivera, L., Barragan-Zarate, G.S., Solano, R., Alexander-Aguilera, A. and Chavez-Piña, A.E. 2023. Mexican orchid (*Prosthechea karwinskii*) and use in cardiovascular protection: Cellular and physiological aspects. In book: Ancient and Traditional Foods, Plants, Herbs and Spices used in Cardiovascular Health and Disease. Taylor and Francis.

Le, H.L., Nguyen, T.M.H., Vu, T.T., Nguyen, T.T.O., Ly, H.D.T., Le, N.T., Nguyen, V.H. and Nguyen, T.V.A. 2022. Potent antiplatelet aggregation, anticoagulant and antioxidant activity of aerial Canna x generalis L.H Bailey & E.Z Bailey and its phytoconstituents. South African Journal of Botany 147, 882-893. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.035

Leite, P.M., Miranda, A.P.N., Gomes, I., Rodrigues, M.L., Camargos, L.M., Amorim, J.M., Duarte, R.C.F., Faraco, A.A.G., Carvalho, M.G. and Castilho, R.O. 2023. Antithrombotic potential of *Lippia alba*: A mechanistic approach. Journal of Ethnopharmacology 301. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115744

López-Pérez, A., Hernández-Juárez, J., Solano, R., Majluf-Cruz, A., Hernández-Cruz, P.A. and Lagunez-Rivera, L. 2022. *Laelia furfuracea* Lindl.: an endemic mexican orchid with anticoagulant activity. Journal of the Mexican Chemical Society 66. https://doi.org/10.29356/jmcs.v66i1.1588

Mastenbroek, T.G., van Geffen, J.P., Heemskerk, J.W.M. and Cosemans, J.M.E.M. 2015. Acute and persistent platelet and coagulant activities in atherothrombosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis 13, S272-S280. https://doi.org/10.1111/jth.12972

Nguyen, A.B., Iqbal, O., Block, R.C. and Mousa, S.A. 2023. Prevention and treatment of atherothrombosis: Potential impact of nanotechnology. Vascular Pharmacology 148, 107127. https://doi.org/10.1016/j.vph.2022.107127

Olie, R.H., van der Meijden, P.E.J. and ten Cate, H. 2018. The coagulation system in atherothrombosis: Implications for new therapeutic strategies. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2, 188-198. https://doi.org/10.1002/rth2.12080

Padilla, R., Gaillard, V., Le, T.N., Bellvert, F., Chapulliot, D., Nesme, X., Dessaux, Y., Vial, L., Lavire, C. and Kerzaon, I. 2021. Development and validation of a UHPLC-ESI-QTOF mass spectrometry method to analyze opines, plant biomarkers of crown gall or hairy root diseases. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 1162. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122458

Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2, 270-278. https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498

Scherer, R. and Godoy, H.T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry,112: 654-658.

Shen, S., Wang, J., Chen, X., Liu, T., Zhuo, Q. and Zhang, S.Q. 2019. Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. Food Chemistry 293, 169-177. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.105

Shi, Y.-p., Zhang, Y.-g., Li, H.-n., Kong, H.-t., Zhang, S.-s., Zhang, X.-m., Li, X.-b., Liu, K.-c., Han, L.-w. and Tian, Q.-p. 2020. Discovery and identification of antithrombotic chemical markers in Gardenia Fructus by herbal metabolomics and zebrafish model. Journal of Ethnopharmacology 253, 112679. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112679

Swain, T. and Hillis W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J Sci Food Agric 10:63-68.

Tang, X., Cui, Y. and Feng, B. 2024. The chemical constituents and metabolite profiles of Huangqin decoction in normal and ulcerative colitis rats by UHPLC-Q-TOF/MS analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 237, 115763. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115763

Torres-Rodríguez, M.L., García-Chávez, E., Berhow, M. and De Mejia, E.G. 2016. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol 188, 266-274. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.057.

Wang, S., Yao, W., Zhu, X., Wang, J., Lu, L., Zhu, N., Lan, T., Kuang, Y., Zhu, W., Liu, R. and Huang, L. 2023. Exploring the mechanism of the antithrombotic effects of *Pueraria lobata* and *Pueraria lobata* var. thomsonii based on network pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 300, 115701. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115701

Wang, Y., Tang, C. and Zhang, H. 2015. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl_4-induced oxidative liver injury in mice. Journal of Food and Drug Analysis 23, 310-317. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.002

Wolfe, K.L. and Rui, H.L. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 8896-8907. https://doi.org/10.1021/jf0715166

Yeh, C.H., Yang, J.J., Yang, M.L., Li, Y.C. and Kuan, Y.H. 2014. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF-κB pathway. Free Radical Biology and Medicine 69, 249–257. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.028

Yin, Q., Zhang, X., Liao, S., Huang, X., Wan, C.C. and Wang, Y. 2023. Potential anticoagulant of traditional chinese medicine and novel targets for anticoagulant drugs. Phytomedicine 116, 154880. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154880

Zaragozá, C., Monserrat, J., Mantecón, C., Villaescusa, L., Álvarez-Mon, M.Á., Zaragozá, F. and Álvarez-Mon, M. 2021. Binding and antiplatelet activity of quercetin, rutin, diosmetin, and diosmin flavonoids. Biomedicine and Pharmacotherapy 141, 111867. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111867

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Efecto de extractos etanólicos de *Ardisia compressa* Kunth y acaricidas botánicos comerciales en *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae)

Effect of ethanolic extracts of *Ardisia compressa* Kunth and commercial botanical acaricides on *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae)

Esaú Ruiz-Sánchez[1], Jesús Molina-Maldonado[1], Marcos Cua-Basulto[2*], Emanuel Hernández-Núñez[2], Rubén Andueza-Noh[1], y Kati Medina-Dzul[1]

[1] Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, Avenida Tecnológico S/N, Municipio de Conkal, C.P. 97345. Conkal, Yucatán, México.

[2] Departamento de Recursos del Mar, CINVESTAV-IPN Unidad Mérida, C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México.

ABSTRACT

Tetranychus urticae is a polyphagous pest that causes severe damage to agricultural crops in Mexico. The use of plant acaricides is an efficient alternative for its control and is also environmentally friendly. The objective of this study was to evaluate the effect of ethanolic extract (EE) from *Ardisia compressa* (Myrsinaceae) and commercial botanical acaricides, on *T. urticae* in the laboratory and greenhouse. For the laboratory experiments, eggplant leaf discs (5 cm in diameter) were immersed for 5 s in the extracts and commercial products as treatments. Each disc was deposited with 15 adults and mortality was recorded at 6 and 12 h. For the greenhouse evaluation, the treatments were applied to two-month-old eggplants that were previously infested with *T. urticae*. The population density was determined before the application of the treatments and on days 1, 2 and 3 after the application. The EE of *Ardisia* YRP, *Ardisia* CTia, and the acaricides based on oil of *Zea mays* and *Glycine max* caused the highest mortality. Similarly, these treatments caused suppression of the population density of *T. urticae* in the greenhouse. The use of plant derived is a promising for the management of two-spotted spider mite in agriculture.

Keywords: pest mite; plant acaricides; population suppression; new alternatives.

RESUMEN

Tetranychus urticae es una plaga polífaga que ocasiona fuertes daños a los cultivos agrícolas en México. El uso de acaricidas vegetales es una alternativa eficiente para su control y a su vez amigable con el ambiente. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de extractos etanólicos (EE) *Ardisia compressa* (Myrsinaceae) y acaricidas botánicos comerciales en *T. urticae* en laboratorio e invernadero. En laboratorio, se trataron discos foliares de berenjena (5 cm de diámetro) sumergiéndolos por 5 s en los extractos y productos comerciales. En cada disco se depositaron 15 adultos y se registró la mortalidad a las 6 y 12 h. En invernadero, se aplicaron los tratamientos a plantas de berenjena de dos meses de edad que previamente estaban infestadas con *T. urticae*. La densidad poblacional se determinó antes de la aplicación de los tratamientos y a los días 1, 2 y 3 después de la aplicación. Los extractos etanólicos de *Ardisia* YRP, *Ardisia* CTia y los acaricidas *Zea mays* y *Glycine max* causaron la mortalidad más alta. De igual manera estos tratamientos redujeron la densidad poblacional de *T. urticae* en invernadero. Los acaricidas vegetales son prometedores para el manejo de la araña roja en la agricultura.

Palabras clave: acaro plaga; acaricidas vegetales; supresión poblacional; nuevas alternativas.

INTRODUCCIÓN

La araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es una plaga polífaga que se hospeda en más de 1200 especies de plantas en todo el mundo, atacando árboles frutales, ornamentales, fabáceas, hortalizas y cucurbitáceas donde disminuye el rendimiento en un 10 a 50 % y una perdida en un 50 % (Monroy-Reyes *et al*., 2015; Brust, 2018; Assouguem *et al*., 2022; Talib *et al*., 2023). El daño causado por *T. urticae* es al momento de alimentarse, ya que inserta su estilete en el mesófilo y las células epidérmicas de las hojas, causando una alteración en la fotosíntesis y transpiración disminuyendo el crecimiento afectando la floración y rendimientos en los cultivos (Abdallah *et al*., 2019; Shaabow *et al*., 2019; Golec *et al*., 2020), pero cuando las condiciones son favorables se incrementa la densidad poblacional y los daños pueden ser severos ya que causa necrosis y muerte de las plantas (Goff *et al*., 2014; Golec *et al*., 2020).

La principal forma de controlar la araña roja es mediante el uso de acaricidas convencionales (Van Leeuwen *et al*., 2010; Rincón *et al*., 2019), sin embargo, el uso excesivo de estos productos ha causado resistencia a poblaciones de *T. urticae*, debido a su ciclo de vida corto y alta fecundidad (Van Leeuwen *et al*., 2010). Dentro de las estrategias utilizadas para el manejo de ácaros fitófagos se ha reportado en varios estudios que extractos de diversas plantas (extractos acuosos, extractos etanólicos, aceites esenciales y aceites orgánicos) tienen alta efectividad en la supresión de la densidad poblacional de *T. urticae* logrando ser una de las alternativas para el manejo de ácaros fitófagos (Yáñez *et al*., 2014; Wakgari y Yigezu, 2018; Rincón *et al*., 2019). De igual manera, Premalatha *et al*. (2018) evaluaron 20 extractos de plantas de diferentes especies, de las cuales ocho tuvieron

*Autor para correspondencia: Marcos Cua-Basulto
Correo-e: marcos.cua@itconkal.edu.mx
Recibido: 10 de junio de 2024
Aceptado: 5 de noviembre de 2024
Publicado: 17 de diciembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2361

efecto tóxico agudo sobre *T. urticae*. También, se reportó que los extractos de *Citratus sinensis*, *Datura stramonium*, *Ficus carica*, *Hyoscoyamus muticus*, *Jatropha curcas*, *Mentha pulegium*, *Morus rubra* y *Trichilia havanensis* tienen efectos letales sobre *T. urticae* (Abou-Shosha, 2020; Alpkent *et al*., 2023; Rivera-Hernández *et al*., 2023).

Con respecto al efecto de los acaricidas botánicos comerciales, se ha demostrado que los acaricidas botánicos a base de *Azadirachta indica* (Juss) causan mortalidad del 65 % hasta 100 % en adultos de *T. urticae* y *T. evansi* (Nag *et al*., 2020; Azandémè-Hounmalon *et al*., 2022). A su vez, los acaricidas a base de *Capsicum annum* L. y *Allium sativun* L. reducen en 60 % la densidad poblacional de de *T. urticae* en cultivos de *Platanus orientalis* (Platanaceae) (Fatemi *et al*., 2021). Así también, en evaluaciones en otras especies de ácaros, se documentó que los extractos de *Cinnamomum zeylanicum* y aceite de *Glycine max* disminuyen la densidad poblacional de *Oligonychus* sp. y *Raoiella indica* en campo (Nexticapan-Garcéz *et al*., 2021).

Los extractos vegetales (extractos acuosos, extractos etanólicos) y acaricidas botánicos comerciales ofrecen una alternativa útil para el control de ácaros fitófagos, por su efectividad, poca persistencia en el ambiente y baja toxicidad a organismos benéficos. Estos acaricidas actúan en varios sitios de acción, desde el sistema nervioso central hasta la respiración mitocondrial, y el sistema endocrino durante el crecimiento (Regnault-Roger *et al*., 2012; Rincón *et al*., 2019; Abdel-Khalik *et al*., 2023). Por tanto, el objetivo de estudio es evaluar el efecto de extractos etanólicos (EE) de *Ardisia compressa* (Myrsinaceae) y acaricidas botánicos comerciales sobre *T. urticae* en condiciones de laboratorio e invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de colonia de *T. urticae*

T. urticae se obtuvo de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) cultivadas en el municipio de Conkal, Yucatán, México. La colonia de ácaros se estableció sobre plantas sanas de berenjena (*S. melongena* L.), donde se recolectaron hojas infestadas con ácaros que se fijaron con clips a la parte apical de plantas sanas de berenjena de dos meses de edad, establecidas en un invernadero en el Instituto Tecnológico de Conkal (21° 4′ latitud N y 89° 31′ longitud O). Posterior a tres semanas de la infestación inicial de las hojas, se tuvieron colonias de *T. urticae* con individuos de diferentes estados de desarrollo para los bioensayos.

Preparación de extractos etanólicos y acaricidas botánicos probados

Para el estudio se usaron dos grupos de productos vegetales, cada grupo se evaluó de manera separada: un grupo correspondió a extractos etanólicos de *Ardisia* y otro grupo correspondió a acaricidas botánicos comerciales.

Los extractos acuosos se prepararon con base a la metodología propuesta por Cruz-Estrada *et al*. (2013), donde muestras de hojas de diferentes poblaciones se recolectaron en diferentes municipios de Chiapas, México (Tabla 1) y se secaron a 45 °C por 10 d y se molieron hasta obtener polvo fino (MAN mod. MLU-9090, México). Para la preparación de los extractos etanólicos (EE), se utilizaron muestras con 50g de material pulverizado, a las que se adicionó 500 mL de etanol (grado reactivo). Durante 72 h se mantuvieron en agitación constante a temperatura de 25º. Posteriormente se filtraron en papel Whatman no. 1 para remover el material vegetal. Cada muestra se depositó en un rotavapor a presión de vacío constante para obtener la pasta-extracto de cada población de *Ardisia* (Yamato B0400. Yamato VR300, USA.).

Para la realización de los bioensayos, la pasta-extracto de cada población de *Ardisia* se diluyó en una solución de etanol y tween 80, a una relación de 1:1:1 (peso/volumen/volumen). Posteriormente, se diluyó en agua destilada (100 mL) hasta obtener una concentración final de 0.2 % (p/v) de la pasta-extracto en la mezcla de aplicación de extractos etanólicos (EE). Para el caso de los bioensayos de los acaricidas botánicos comerciales se utilizaron las concentraciones recomendadas por el fabricante. Se utilizó el insecticida químico abamectina como control positivo y agua destilada como control negativo. Los nombres comerciales, dosis y detalles de los acaricidas botánicos comerciales se describen en la Tabla 2.

Tabla 1. Poblaciones silvestres de *Ardisia compressa* Kunth, recolectadas en cuatro municipios del Estado de Chiapas.
Table 1. Populations of wild *Ardisia compressa* Kunth, collected in four municipalities of the state of Chiapas.

ID Extracto	Localidad, Municipio	Altitud (m)	Coordenadas
Ardisia YRP	Río Pupiltillo, Yajalón	500	17º 10′ 14.00″ N, 92º 19′ 49.00″ W
Ardisia YBG	Banco de grava, Yajalón	915	17º 10′ 00.00″ N, 92º 19′ 00.00″ W
Ardisia CJC	Joybé carretera, Chilón	972	17º 01′ 07.00″ N, 92º 09′ 19.66″ W
Ardisia CJR	Joybé río, Chilón	900	17° 01′ 11.77″ N, 92° 09′ 41.76″ W
Ardisia CLC	Las Canchas, Chilón	850	17° 00′ 19.07″ N, 92º 06′ 52.92″ W
Ardisia CTia	Tiaquil, Chilón	1141	17° 11′ 99.00″ N, 92º 52′ 58.61″ W
Ardisia TCA	Coquijaz alto, Tila	1800	17° 17′ 05.40″ N, 92° 28′ 46.20″ W

Tabla 2. Acaricidas botánicos y tasas de aplicación probados en este estudio.
Table 2. Botanical acaricides and application rates tested in this study.

Tratamiento	Nombre comercial (ingrediente activo)	Tasa de aplicación / ha (Cantidad 400 L^{-1})	Empresa
Aceite de *Glycine max*	EPA-90® (Aceite vegetal de *Glycine max*)	3 L	Biokrone S.A. de C.V., México
Aceite de *Zea mays*	Cimax® (Aceite vegetal de *Zea mays*)	4 L	Ultraquimia agrícola, S.A. de C.V.
Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*	CinnAcar® (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*)	3 L	Promotora Técnica Industrial, México.
Extracto de *Azadirachta*	Mix Protectivee-N® (Extracto de *Azadirachta indica*)	6 L	Agrosanidad S.A. de C.V.
Extracto de *Argemone* + *Ricinus*	Star agricola® (Extracto de *Argemone mexicana* + *Ricinus communis*)	2 L	Ultraquimia agrícola, S.A. de C.V.
Extracto de *Cinnamomun* + *Azadirachta* + *Heliposis*	Cinanim® (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum* + *Azadirachta indica* + *Heliopsis longipes*)	2 L	BioKrone México, S.A de C.V.
Abamectina	Abakrone® Abamectina (1.80 %)	0.4 L	BioKrone México, S.A de C.V.
Control	Agua destilada		

Evaluación de toxicidad letal aguda de *T. urticae* en laboratorio

Se hicieron dos experimentos, uno para evaluar los EE de *Ardisia* y otro para evaluar los acaricidas botánicos comerciales. Los ensayos de toxicidad letal se hicieron en adultos de *T. urticae*, para lo cual se cortaron discos foliares de berenjena (*Solanum melongena*) de 5 cm de diámetro y se sumergieron por 5 s en los EE de *Ardisia* o en los acaricidas botánicos comerciales preparados de forma individual en vasos de precipitado de 100 mL. Después de la inmersión, los discos foliares se secaron a temperatura ambiente por 30 minutos. A continuación, los discos foliares se colocaron con el lado adaxial hacia arriba sobre algodón humedecido en cajas de Petri (9 cm de diámetro y 1.5 cm de profundidad). Los bordes de los discos foliares se cubrieron con algodón húmedo para evitar que los ácaros escaparan. Se transfirieron 15 adultos de *T. urticae* en cada disco foliar y se registró la mortalidad a las 6 y 12 h después de la aplicación. Las cajas Petri se mantuvieron en el laboratorio a 24 ± 30 °C y fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. Se consideraron ácaros muertos, aquellos que no se movían después de ser tocados con un pincel fino. Una caja Petri con 15 ácaros representó una repetición. Se evaluaron 10 repeticiones por cada tratamiento (Cua-Basulto *et al*., 2022).

Evaluación de la supresión poblacional de *T. urticae* en invernadero

Para las evaluaciones en invernadero se utilizaron plantas de berenjena de dos meses de edad. La evaluación se hizo en un invernadero con techo de plástico y malla lateral antiáfidos bajo condiciones ambientales fluctuantes (25 - 35°C de temperatura y 55 - 75% de humedad relativa). Las plantas de berenjena se infestaron con adultos de *T. urticae* y tres semanas después, cuando se había establecido la colonia de ácaros, se realizaron las aplicaciones de los tratamientos, dirigiendo la aspersión a ambos lados de las hojas en cobertura total hasta punto de goteo, utilizando un atomizador manual (Klintek ATO-100). La densidad poblacional de *T. urticae* se determinó antes de la aspersión y a los 1, 2 y 3 d después de la aplicación de los tratamientos. Para tales efectos, se cortó una hoja joven por planta y se llevó al laboratorio para contar el número de ácaros (adultos, ninfas y huevos) con la ayuda de un estereoscopio (40x). El área de cada hoja evaluada se midió con un integrador de área foliar (LI-COR®, USA, modelo LI-300C). Una planta representó una réplica. Se evaluaron diez réplicas por cada tratamiento (Cua-Basulto *et al*., 2022).

Análisis de datos

Se usó un diseño completamente al azar para todos los experimentos. Los datos se sometieron a análisis de varianza después de verificar la normalidad y la homocedasticidad (prueba de Shapiro-wilk). Los efectos se consideraron estadísticamente significativos si $P < 0,05$. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico Statgraphics.

RESULTADOS

Toxicidad aguda de EE de *A. compressa* y acaricidas botánicos en *T urticae*

Los extractos EE de *Ardisia* tuvieron efectos moderados pero significativos sobre la mortalidad de *T. urticae* a las 6 h ($F = 135.77$, $gl = 8, 781$, $P < 0.0001$) y a las 12 h ($F = 104.99$, $gl = 8, 81$, $p < 0.0001$) después de la aplicación. El EE de *Ardisia* YRP tuvo el efecto más alto (34.6 - 38.6 % de mortalidad) en ambos periodos de evaluación. El EE de *Ardisia* CTia tuvo efecto significativo, pero a las 12 h de su aplicación (35.3 % de mortalidad). Los demás EE de *Ardisia* causaron entre 18 y 27 % de mortalidad a las 12 h después de su aplicación, en comparación con la abamectina que causo el 100 % de mortalidad a las 6 y 12 h (Figura 1).

Los acaricidas botánicos comerciales tuvieron efectos significativos sobre la mortalidad de *T. urticae* a las 6 h ($F = 182.1$, $gl = 7, 72$, $p < 0.0001$) y 12 h después de la exposición ($F = 165.89$, $gl = 7, 72$, $p < 0.0001$). El acaricida botánico a base de aceite de *Zea mays* tuvo el efecto más alto (62 - 81 %

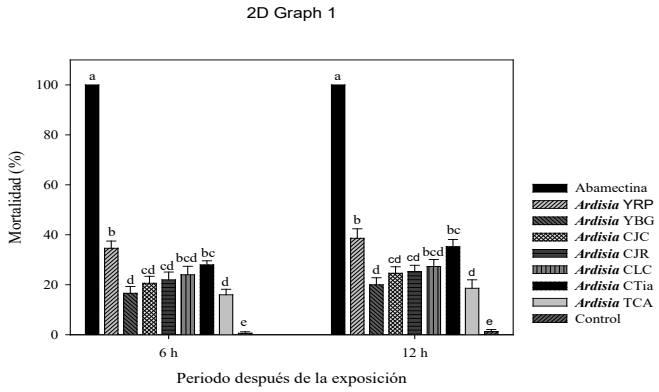


Figura 1. Mortalidad (medias ± error estándar) de adultos de *T. urticae* en laboratorio. Las medias para cada periodo (horas) después de la exposición que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (Tukey P<0.05). Los estadísticos del análisis del efecto se presentan para cada periodo (horas) después de la exposición (HDE).
Figure 1. Mortality (means ± standard error) of *T. urticae* adults in the laboratory. The means for each period (hours) after exposure that do not share the same letter are significantly different (Tukey P<0.05). Effect analysis statistics are presented for each period (hours) after exposure (HDE).

de mortalidad) desde las 6 y 12 h después de la aplicación, mientras que el aceite de *Glycine max* causó 54 % de mortalidad hasta las 12 h después de su aplicación en comparación con la abamectina que causo el 100 % de mortalidad a las 6 y 12 h. Los otros acaricidas botánicos causaron entre 17 y 26 % de mortalidad (Figura 2).

Supresión de la densidad poblacional en invernadero

Todos los EE de *Ardisia* causaron supresión de la densidad poblacional de *T. urticae* a los 1, 2 y 3 d después de la exposición. En adultos, los EE de *Ardisia* YRP y *Ardisia* CTia redujeron entre 4.0 a 6.4 adultos por cm^2 (Figura 3A). En ninfas entre 6.8 y 7.6 por cm^2 (Figura 3B) y en huevos entre 11.7 a 15.3 huevos por cm^2 (Figura 3C).

Para el caso de los acaricidas botánicos comerciales a base de *Zea mays* y *Glycine max*, minimizaron la densidad poblacional de adultos registrando valores entre 1.5 y 3.2 adultos por cm^2 (Figura 4A). En ninfas entre 2.4 a 3.0 por cm^2 (Figura 4B). Del mismo modo en huevos con valores de 13.0 a 18.0 huevos por cm^2 después de la aplicación Figura 4C). El extracto de *Azadirachta indica*, extracto *Argemone mexicana* + *Ricinus* y extracto de *Cinnamomum* + *Azadirachta* + *Heliopsis* causaron una reducción intermedia en la densidad poblacional con valores en adultos (2.9 a 5.5 por cm^2), en ninfas (4.0 a 5.9 por cm^2) y huevos (15.0 a 21.5 por cm^2),

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico letal y la supresión poblacional de extractos etanólicos (EE) de hojas de *A. compressa* y acaricidas botánicos comerciales en *T. urticae*. En la evaluación de efecto tóxico letal (6 y 12 h) se observó que los EE de *Ardisia* YRP y *Ardisia* CTia fueron los más tóxicos (35 - 38 % de mortalidad) y en el caso de los acaricidas botánicos comerciales los aceites de *Zea mays* y *Glycine max* fueron los más efectivos (54 - 81 % de mortalidad). Se podría considerar entonces que los EE de *Ardisia* tuvieron efectos tóxicos letales intermedios y los acaricidas botánicos comerciales tuvieron efectos altos. En trabajos con extractos vegetales experimentales se ha visto hasta 70 % de mortalidad de adultos de *T. urticae*, como es el caso de los extractos etanólicos de *Chenopodium quinoa* y *Solanum nigrum* (Harder *et al*., 2016; Vergel *et al*., 2016). Incluso, extractos metanólicos de *Ardisia japónica* causaron mortalidad del 75. 6 % en *T. urticae,* pero hasta las 48 h después de la aplicación (Lee *et al*., 2011). El efecto tóxico letal en los extractos de *Ardisia* se puede atribuir a la presencia de metabolitos secundarios como polifenoles, saponinas, triterpenoides y quinonas (De Mejía y Ramírez-Mares, 2011; Amin *et al*., 2015). Estos grupos de metabolitos secundarios han mostrado efectividad sobre especies de ácaros fitófagos (Sivira *et al*., 2011; Ebadollahi *et al*., 2016).

Para el caso de los acaricidas a base de aceite de *Zea mays* y *Glycine max* tuvieron efectos tóxicos letales altos. El aceite orgánico de especies vegetales se ha usado para el desarrollo de acaricidas o insecticidas químicos. por ejemplo, el aceite de oliva (*Olea europaea*), clavo (*Syzygium aromaticum*)

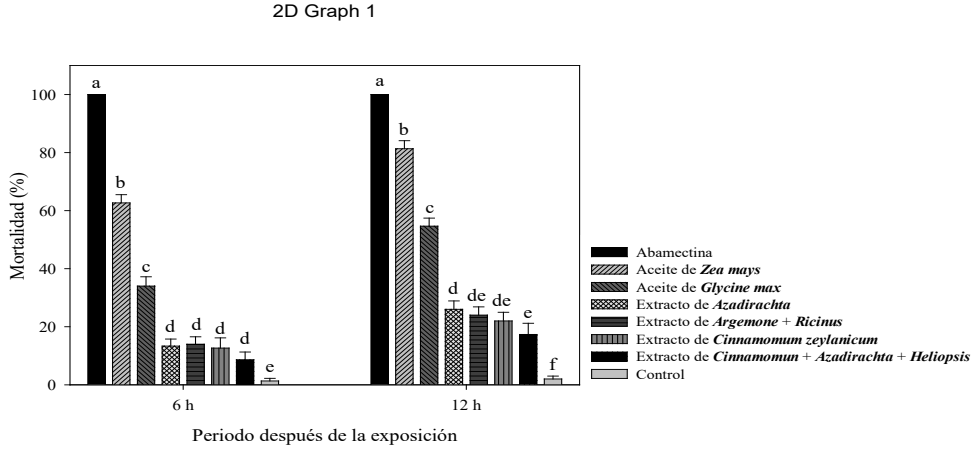


Figura 2. Mortalidad (medias ± error estándar) de adultos de *T. urticae* en laboratorio. Las medias para cada periodo (horas) después de la exposición que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (Tukey P < 0.05). Los estadísticos del análisis del efecto se presentan para cada periodo (h) después de la exposición (HDE).
Figure 2. Mortality (means ± standard error) of *T. urticae* adults in the laboratory. The means for each period (hours) after exposure that do not share the same letter are significantly different (Tukey P < 0.05). Effect analysis statistics are presented for each period (h) after exposure (HDE).

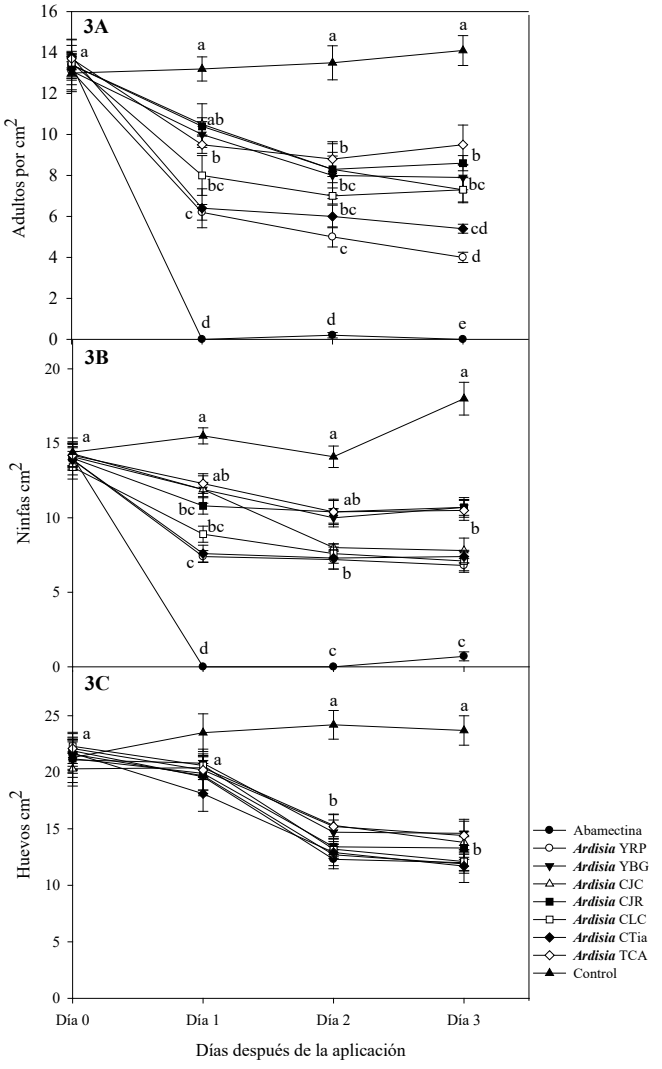


Figura 3. Supresión de la densidad poblacional (media ± error estándar) de adultos (A), ninfas (B) y huevos (C) de *T. urticae* en invernadero. Las medias para el mismo periodo (día) posteriores a la exposición que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (Tukey P < 0.05).

Figure 3. Suppression of population density (mean ± standard error) of adults (A), nymphs (B) and eggs (C) of *T. urticae* in a greenhouse. The means for the same period (day) after exposure that do not share the same letter are significantly different (Tukey P < 0.05).

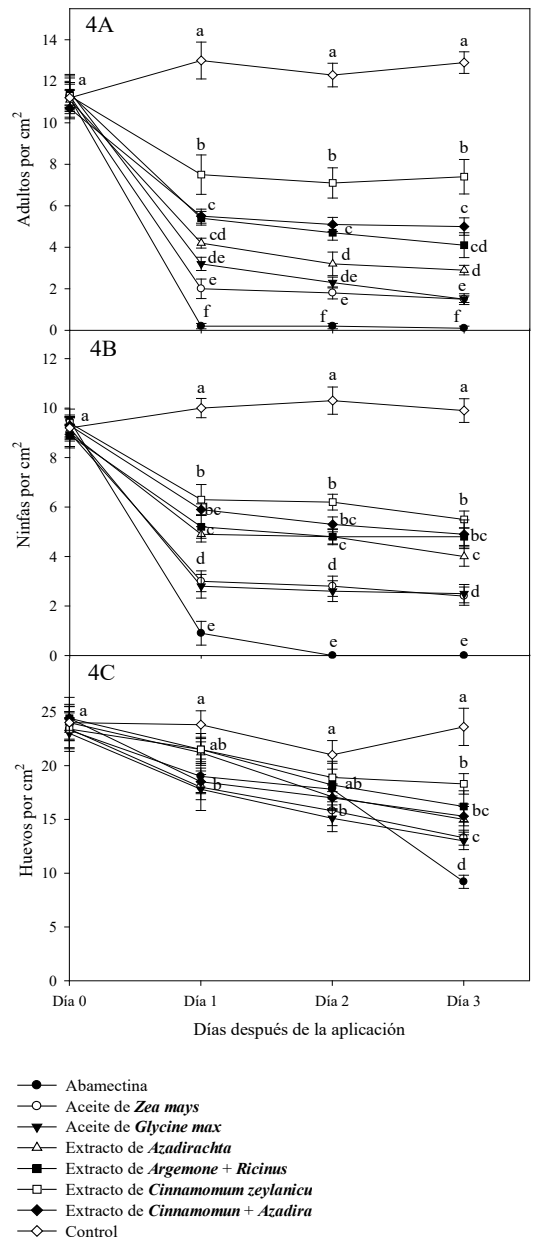


Figura 4. Supresión de la densidad poblacional (media ± error estándar) de adultos (A), ninfas (B) y huevos (C) de *T. urticae* en invernadero. Las medias para el mismo periodo (día) posteriores a la exposición que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (Tukey P < 0.05). Los estadísticos del análisis del efecto se presentan por cada periodo (día) después del tratamiento acaricida (DDT).

Figure 4. Suppression of population density (mean ± standard error) of adults (A), nymphs (B) and eggs (C) of *T. urticae* in a greenhouse. The means for the same period (day) after exposure that do not share the same letter are significantly different (Tukey P < 0.05). The effect analysis statistics are presented for each period (day) after acaricidal treatment (DDT).

y ricino (*Ricinus communis*), pueden ocasionar hasta 100 % de mortalidad de *T. urticae* en las primeras 72 h después de la aplicación (Bashiri *et al*., 2021; Meteab *et al*., 2021). En los últimos 20 años el aceite a base de *Glycine max* ha mostrado actividad tóxica contra ácaros, y al igual que en el presente estudio se ha documentado hasta 85 % de mortalidad entre las 24 a 72 horas de su aplicación (Moran *et al*., 2003; Baker *et al*., 2018; Bashiri *et al*., 2021). La alta efectividad del aceite de *Glycine max* en la supresión poblacional de ácaros ha sido documentada en varios estudios (Lancaster *et al*., 2002; Nexticapan-Garcéz *et al*., 2021), ya que el efecto toxico letal sobre los ácaros puede estar relacionado con la asfixia por el bloqueo de espiráculos de adultos e inmaduros (Umetsu y Shirai, 2020) o metabolitos secundarios presentes en los aceites, como taninos, terpenos, fenoles (Mex-Álvarez *et al*., 2016; Nawaz *et al*., 2018), flavonoides y saponinas (Dixit *et al*., 2011; De la Rosa *et al*., 2012; Da Graca *et al*., 2016), donde se ha observado que estos compuestos tienen alta efectividad en ácaros fitófagos (Tak e Isman, 2017; Heinz-Castro *et al*., 2021).

Con respecto a las evaluaciones en invernadero los EE de *Ardisia* YRP y *Ardisia* CTia, nuevamente resultaron ser los más efectivos en la supresión de la densidad poblacional de adultos y ninfas de *T. urticae*. Para el caso de los acaricidas botánicos comerciales nuevamente los acaricidas a base de aceites *Zea mays* y *Glycine max* tuvieron los efectos más altos. Existe poca información sobre extractos etanólicos en condiciones de invernadero o campo, sin embargo, se ha podido documentar en estudios de laboratorio que extractos etanólicos de *Ardisia japónica*, *Magnolia alejandrae* y *Moringa oleífera* son efectivos manteniendo su efecto al día 1 hasta 3 días posterior a su aplicación (Lee *et al*., 2011; Heinz-Castro *et al*., 2021; Olazaran-Santibañez *et al*., 2024), de igual manera los aceites *Zea mays* y *Glycine max* su efecto puede mantenerse al día 1 a 14 días posteriores a su aplicación (Nexticapan-Garcéz *et al*., 2021; Cua-Basulto *et al*., 2023), estos resultados sugieren el potencial de extractos etanólicos y acaricidas botánicos para el manejo de ácaros fitófagos.

Con base en los resultados de este estudio, el uso de EE de *Ardisia* y aceites botánicos comerciales a base de *Zea mays* y *Glycine max* son eficaces para el manejo de *T. urticae* y es necesario continuar con evaluaciones de campo en varios cultivos para validar la efectividad de los tratamientos.

CONCLUSIONES

Los EE de *Ardisia* YRP y *Ardisia* CTia y los acaricidas botánicos comerciales a base de aceite *Glycine max* y *Zea mays* causaron alta mortalidad de adultos de *T. urticae* en laboratorio. Estos tratamientos también tuvieron alta efectividad en la supresión de la densidad poblacional de adultos, ninfas y huevos de *T. urticae* en condiciones de invernadero. Los extractos etanólicos de *Ardisia compressa* y los aceites botánicos comerciales son una alternativa efectiva para el manejo de *T. urticae* en la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONAHCYT México por la beca otorgada a Marcos Cua Basulto. Beca posdoctoral número 4923351. Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el apoyo financiero al proyecto 20900.24-P "Evaluación de actividad biológica contra fitoparásitos y perfil cromatográfico de extractos foliares de *Ardisia compressa*".

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abdallah, A.M., Ismail, M.S., Aboghalia, A.H. y Soliman, M.F. 2019. Factors affecting population dynamics of *Tetranychus urticae* and its predators on three economic plants in Ismailia, Egypt. *International Journal of Tropical Insect Science. 39:* 115-124.

Abdel-Khalik, A.R., El-Dein, S.A.E. y Mahmoud, R.H. 2023. Efficiency of three plant extracts for controlling *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae) in laboratory and semi-field conditions. Acarines: Journal of the Egyptian Society of Acarology. 17: 37-44.

Abou-Shosha, M.A.A. 2020. Field trial of three plant extracts against *Tetranychus urticae* population as a comparative with acaricidal (Abamectin) on two vegetable crops. Journal of Plant Protection and Pathology. 11: 473-476.

Alpkent, Y.N., Ulusoy, S. y Erturk, S. 2023. Acaricidal efficacy of aqueous extracts from different plants on *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae). Research Square. 132: 1-18.

Amin, M.N., Banik, S., Ibrahim, M., Moghal, M.M.R., Majumder, M.S., Siddika, R., Alam, M.K., Jitu, K.M.R.M. y Anonna, S.N. 2015. A Study on *Ardisia solanacea* for evaluation of phytochemical and pharmacological properties. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 7(1): 8-15.

Assouguem, A., Kara, M., Mechchate, H., Korkmaz, Y.B., Benmessaoud, S., Ramzi, A., Abdullah, K.R., Noman, O.M., Farah, A. y Lazraq, A. 2022. Current situation of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in northern Africa: The sustainable control methods and priorities for future research. Sustainability. 14(4): 1-14.

Azandémè-Hounmalon, G.Y., Onzo A., Adandonon, A., Houedenou, J., Djossou, R., Gnanvossou, D. y Tamò, M. 2022. Comparative Effects of Some Botanical Extracts and Chemicals in Controlling the Red Spider Mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard on Solanaceous Crops. European Scientific Journal. 18(33):110-120.

Baker, B.P., Grant, J.A. y Malakar-Kuenen, R. 2018. Soybean oil profile, active ingredient. Eligible for Minimum Risk Pesticide Use. New York State. Integrated Pest Management. 1-11.

Bashiri, M., Moharramipour, S. y Negahban, M. 2021. Developing a vegetable oil formulation as a safe acaricide against *Tetranychus urticae*. Journal of Agricultural Science and Technology. 23: 1281-1295.

Brust, G.E. y Gotoh, T. 2018. Mites: biology, ecology, and management. In: Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato. W. Wakil; G.E Brust y T.M Perring (ed.), 111-130. Elsevier, London.

Cruz-Estrada, A., Gamboa-Angulo, M., Borges-Argáez, R. y Ruiz-Sánchez, E. 2013. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae). Electronic Journal of Biotechnology. 16(1): 6-6.

Cua-Basulto, M., Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Reyes-Ramírez, A., Ballina-Gómez, H. y Hernández-Núñez, E. 2022. Efectos de los acaricidas químicos sobre la mortalidad de la araña de dos manchas *Tetranychus urticae* koch (Acari: Tetranychidae). Tropical Subtropical Agroecosystems. 25(1): 1-9.

Cua-Basulto, M., Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Reyes-Ramírez, A., Ballina-Gómez, H., Hernández-Núñez, E., Martin-Mex, R., Herrera-Gorocica, A. y Ruiz-Jiménez, A.L. 2023. Effects of botanical acaricides on *Tetranychus urticae* and compatibility with the predatory mite *Amblyseius swirskii*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 56(17): 1359-1371.

Da Graça, J.P., Ueda, T.E., Janegitz, T., Vieira, S.S., Salvador, M.C., De Oliveira, M.C.N. y Hoffmann-Campo, C.B. 2016. The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug, *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*. Phytochemistry. 131: 84-91.

De la Rosa, C., Torres, C.G., Camacho, O.R., Calderón, Z.M., Herrera, E.U. y Osorio, M.Y. 2012. Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycine max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. Revista Colombiana de Ciencias de la Salud. 1(1): 39-43.

De Mejía, E.G. y Ramírez-Mares, M.V. 2011. *Ardisia*: health-promoting properties and toxicity of phytochemicals and extracts. Toxicology Mechanisms and Methods. 21(9):667-674.

Dixit, A.K., Antony, J.I.X., Sharma, N.K. y Tiwari, R.K. 2011. Soybean constituents and their functional benefits. Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry. V.K. Tiwari and B.B. Mishra (ed.), pp. 367-383.

Ebadollahi, A., Jalali-Sendi, J. y Razmjou, J. 2016. Toxicity and phytochemical profile of essential oil from Iranian *Achillea mellifolium* L. against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Toxin Reviews 35(1):1-5

Fatemi, M., Torabi, E., Olyaie, A. y Taherian, M. 2021. The efficacy of some chemical and botanical pesticides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on *Platanus orientalis* (Platanaceae) in urban areas. Persian Journal Acarology. 10(3): 309-319.

Goff, G.J.L., Hance, T.C., Detrain, C.J., Deneubourg, J.L. y Mailleux, A.C. 2014. Impact of living with kin/non-kin on the life history traits of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology 63(1):37-47.

Golec, J.R., Hoge, B. y Walgenbach, J.F. 2020. Effect of biopesticides on different *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) life stages. Crop Protection. 128: 1-8.

Harder, M.J., Tello, V.E. y Giliomee, J.H. 2016. The acaricidal effect of ethanolic extracts of *Chenopodium quinoa* Willd. On *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). African Entomology. 24(1): 50-60.

Heinz-Castro, R.T.Q., Arredondo-Valdés, R., Ordaz-Silva, S., Méndez-Cortés, H., Hernández-Juárez, A., y Chacón-Hernández, J.C. 2021. Bioacaricidal potential of *Moringa oleifera* ethanol extract for *Tetranychus merganser* Boudreaux (Acari: Tetranychidae). Plants. 10(6): 1-10.

Lancaster, A.L., Deyton, D.E., Sams, C.E., Cummis, J.C., Pless, C.D. y Fare, D.C. 2002. Soybean oil control two-spotted spider mites on burning bush. Journal of Environmental Horticulture 20(2):86-92.

Lee, G.Y., Han, Y.H., Soh, H.S., Lee, H.J. y Kim, S.K. 2011. Insecticidal activities of plant extracts against *Tetranchus urticae*. Korean Journal of Organic Agriculture. 19: 639-642.

Meteab, H.R., Kadhim, J.H. y Al-Abedy, A.N. 2021. Effect of some vegetable oils on life stages of the two-spotted spider mite *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on eggplant. Natural Volatiles & Essential Oils. 8: 2025-2030.

Mex-Álvarez, R.M., Garma-Quen, P.M., Bolívar-Fernández, N.J. y Guillén-Morales, M.M. 2016. Análisis proximal y fitoquímico de cinco variedades de maíz del estado de Campeche (México). Revista Latinoamericana Recursos Naturales. 12 (2): 74-80.

Moran, R.E., Deyton, D.E., Sams, C.E, Pless, C.D. y Cummins, J.C. 2003. Soybean oil as a summer spray for apple: European red mite control, Net CO_2 assimilation, and phytotoxicity. HortScience 38: 234-238.

Monroy-Reyes, B., Posos-Ponce, P. y Posos, P.O.A. 2015. Control de araña roja *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) utilizando el acaricida Torque 500 sc (Óxido de fenbutatin) en el cultivo de frambuesa. Entomología Mexicana. 2: 332-338.

Nag, S., Bhullar, M.B. y Kaur, P. 2020. Efficacy of biorationals against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, (Acari: Tetranychidae) infesting green pepper cultivated under protected conditions. International Journal of Acarology. 46(7): 489-495.

Nawaz, H., Muzaffar, S., Aslam, M., y Ahmad, S. 2018. Phytochemical composition: Antioxidant potential and biological activities of corn. Corn - Production and Human Health in Changing Climate. Amanullah and F. Shah (ed). Pp 49-68.

Nexticapan-Garcéz, A., Cua-Basulto, M., Martín-Mex, R., Pérez-Brito, D., Larqué-Saavedra, A., Villanueva-Couoh, E., Pérez-Gutiérrez, A. y Ruiz-Sánchez, E. 2021. Effects of botanical acaricides on *Raoiella indica* and *Oligonychus* sp. and their toxicity on two species of phytoseiid predatory mites. Archives Phytopathology and Plant Protection 54(19-20): 2221-2232.

Olazaran-Santibañez, F.E., Heinz-Castro, R.T.Q., Rivera, G., Rocandio-Rodríguez, M., Navarrete-Carriola, D.V., Zapata-Campos, C.C., Moreno-Ramírez, Y.R. y Chacón-Hernández, J.C. 2024. Evaluation of ethanol extract of *Magnolia alejandrae* (Magnoliales: Magnoliaceae) against *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae. Journal of Entomological Science. 59(2): 193-210.

Premalatha, K., Nelson, S.J., Vishnupriya, R., Balakrishnan, S. y Santhana K.V.P. 2018 Acaricidal activity of plant extracts on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Journal of Entomology and Zoology Studies 6(1): 1622-1625.

Regnault-Roger, C., Vincent, C. y Arnason, J.T. 2012. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. Annual Review of Entomology. 57: 405-424.

Rincón, R.A., Rodríguez, D. y Coy-Barrera, E. 2019. Botanicals against *Tetranychus urticae* Koch under laboratory conditions: A survey of alternatives for controlling pest mites. Plants. 8(8): 272.

Rivera-Hernández, M., Luna-Guevara, J.J., Aragón-García, A., Pérez-Torres, B.C. y López-Olguin, J.F. 2023. Effect of extracts of *Citrus sinensis* (Rutaceae) and *Trichilia havanensis* (Meliaceae) in mortality and repellence of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Biotecnia. 25(3): 154-161

Shaabow, A., Ahmad, M. y Zidan, R. 2019. The biological control of two spotted spider mites using the predatory mite on bean grown under greenhouse conditions. International Journal of Agriculture & Enrironmental Sience. 6(2): 63-69.

Sivira, A., Sanabria, M.E., Valera, N. y Vásquez, C. 2011. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). Entomología neotropical, 40: 375-379.

Tak, J.H. e 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.

Talib, Y.J., Abass, M.H. y Thamer, N.K. 2023. Efficiency of some jasmonic acid concentrations on mortality of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch on eggplant. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 1225: 1-8.

Umetsu, N. y Shirai, Y. 2020. Development of novel pesticides in the 21st century. Journal of Pesticides Science. 45(2): 54-74.

Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W. y Tirry L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 40(10): 563-572.

Vergel, S.J.N., Rodríguez, C.L., Rodríguez, C.D. y Coy-Barrera, E. 2016. Effect of acaricidal activity of *Solanum nigrum* on *Tetranychus urticae* Koch under laboratory conditions. African Journal of Biotechnology. 15(10): 363-369.

Wakgari, M. y Yigezu, G. 2018. Evaluation of some botanical extracts against two-spotted spider mite (Tetranychidae: *Tetranychus urticae* koch) under laboratory condition. Ethiopian Journal of Science. 41(1): 1-7.

Yánez, P.M., Escoba, A., Molina, C. y Zapata, G. 2014. A comparison between acaricidal activity of three essential oils from *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* and *Tetranychus urticae*. Revista de Ciencias de la Vida. 19(1):21-33.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Toxicidad aguda de pimetrozina y flonicamid en dos especies de abejas sin aguijón

Acute toxicity of pymetrozine and flonicamid in two stingless bee species

Gimena Uh-Ek[1], Esaú Ruiz-Sánchez[1], Horacio Ballina-Gómez[1], and Cristian Góngora-Gamboa[1]*

[1] Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, Avenida Tecnológico S/N, Municipio de Conkal, C.P. 97345. Conkal, Yucatán, México.

ABSTRACT

Stingless bees *Melipona beecheii* and *Nannotrigona perilampoides* are crucial for the Neotropical region due to their ecological and economic importance. However, the widespread use of systemic insecticides in agroecosystems raises concerns about their potential adverse effects on these essential pollinators. This study assessed the acute effects (2 - 12 h) of flonicamid (Beleaf®) and pymetrozine (Plenum®) on the survival and locomotion of *M. beecheii* and *N. perilampoides*. Bees were exposed to 250 mg/L of flonicamid and 500 mg/L of pymetrozine via oral and residual contact in the laboratory. Survival was measured at four, eight, and 12 h, while locomotion was evaluated by walking speed and flight activity at two hours. In *M. beecheii*, oral exposure impacted survival only at 12 h, with no residual effects. In *N. perilampoides*, oral exposure did not affect survival, but residual exposure did. Both insecticides reduced locomotion in *M. beecheii* only with oral exposure, whereas *N. perilampoides* showed negative effects from both exposure types. These findings highlight the importance of evaluating systemic insecticides' impacts on different bee species and considering multiple exposure routes to accurately assess toxicity and mitigate risks to pollination and the environment.

Keywords: Survival; locomotion; *Melipona beecheii*; *Nannotrigona perilampoides*

RESUMEN

Las abejas sin aguijón *Melipona beecheii* y *Nannotrigona perilampoides* son vitales en la región Neotropical por su importancia ecológica y económica. Sin embargo, el uso de insecticidas sistémicos en agroecosistemas plantea preocupaciones sobre sus efectos adversos en estos polinizadores. Este estudio evaluó los efectos agudos (2 - 12 h) de los insecticidas flonicamid (Beleaf®) y pimetrozina (Plenum®) en la supervivencia y locomoción de *M. beecheii* y *N. perilampoides*. Las abejas se expusieron a dosis de 250 mg/L de flonicamid y 500 mg/L de pimetrozina mediante vía oral y residual en laboratorio. La supervivencia se evaluó a las 4, 8 y 12 h, y la locomoción mediante la velocidad de caminata y actividad de vuelo a las dos h. En *M. beecheii*, la exposición oral afectó la supervivencia solo a las 12 h, sin efectos residuales. En *N. perilampoides*, la exposición oral no afectó la supervivencia, pero la exposición residual sí. Ambos insecticidas redujeron la locomoción en *M. beecheii* solo por exposición oral, mientras que en *N. perilampoides* ambos tipos de exposición mostraron efectos negativos. Estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar los efectos de insecticidas sistémicos en diferentes especies de abejas y múltiples vías de exposición para mitigar los riesgos ambientales.

Palabras clave: Supervivencia; locomoción; *Melipona beecheii*; *Nannotrigona perilampoides*

INTRODUCCIÓN

En la agricultura se utilizan diversos agroquímicos para proteger los cultivos asegurando una mayor producción al reducir las pérdidas de cultivos (Sharma *et al*., 2019). En México, durante el año 2021, se emplearon un total de 43,578.14 toneladas de agroquímicos, donde los insecticidas representaron aproximadamente el 22.9 % (FAOSTAT, 2021). Los insecticidas pueden tener impactos negativos en el ambiente, incluyendo efectos perjudiciales en organismos no objetivo como las abejas (Zhang *et al*., 2018; Devi *et al*., 2022). En las últimas dos décadas, se ha observado un creciente interés en las evaluaciones toxicológicas de insecticidas en abejas polinizadoras, debido a la preocupante disminución de sus poblaciones (Silviter *et al*., 2021; Bernardes *et al*., 2022). Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) han sido incluidas en las evaluaciones toxicológicas, pero con menor frecuencia, con sólo 7.84 % de los estudios comparado con el 79.7 % de estudios en abejas melíferas (Bernardes *et al*., 2022). Las abejas sin aguijón cuentan con más de 500 especies distribuidas en los trópicos del planeta y desempeñan un papel crucial en la polinización. Se estima que son responsables de polinizar entre el 40 % y el 90 % de las plantas nativas (Cham *et al*., 2018; Quezada-Euán, 2018). Estas abejas incluyen diversas especies de importancia económica. Por ejemplo, *Melipona beecheii* y *Nannotrigona perilampoides*, cuya distribución abarca desde el centro de México hasta el sur de Costa Rica (Quezada-Euán, 2018). Se asocian con cultivos como el achiote (*Bixa orellana* L.), chile habanero (*Capsicum chinense* Jack.) y aguacate (*Persea americana* Mill.) (Caro *et al*., 2017; Real-Luna *et al*., 2022). Además, *M. beecheii* es especialmente destacada en la práctica de la meliponicultura (González-Acereto *et al*., 2006).

Los insecticidas sistémicos plantean una preocupación ya que son absorbidos por las plantas y transportados al néctar o al polen mediante la conducción de la savia, lo que expone a las abejas a la contaminación por ingestión (Goulson, 2013). Esta contaminación también puede ocurrir cuando las

*Autor para correspondencia: Cristian Góngora-Gamboa
Correo-e: cristian.gongora@itconkal.edu.mx
Recibido: 11 de junio de 2024
Accepted: 7 de septiembre de 2024
Publicado: 8 de octubre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2356

abejas entran en contacto con residuos de insecticidas, resultado de la aplicación foliar a los cultivos (Fairbrother *et al*., 2014). La pimetrozina y el flonicamid, dos insecticidas sistémicos comunes, afectan los receptores sensoriales llamados órganos cordotonales en las articulaciones de los insectos (Yack, 2004; Kavlie y Albert, 2013; Maienfisch, 2019). Estos receptores controlan la locomoción y detectan estímulos externos como gravedad, sonido y vibraciones del sustrato (Field y Matheson, 1998; Yack, 2004; Kavlie y Albert, 2013). La pimetrozina interrumpe la coordinación locomotora de los insectos e inhibe la alimentación a través de la sobreestimulación de los receptores de los órganos cordotonales (Nesterov *et al*., 2015; Salgado, 2017; Huang *et al*., 2023). Por otro lado, el flonicamid también actúa selectivamente sobre los órganos cordotonales del insecto, pero inhibe la actividad de la nicotinamidasa, una enzima implicada en una variedad de procesos metabólicos, incluyendo la respiración celular, la producción de energía y la reparación del ADN (Spalthoff *et al*., 2022; Qiao *et al*., 2022).

La falta de estudios sobre el impacto de la pimetrozina y el flonicamid en las abejas sin aguijón resalta la necesidad de investigar los efectos de estos plaguicidas en estos insectos clave. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la supervivencia y los efectos subletales en la locomoción, específicamente, en la actividad de caminata y vuelo, de las abejas sin aguijón *M. beecheii* y *N. perilampoides* mediante ingestión oral o exposición residual a los insecticidas sistémicos flonicamid y pimetrozina en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de abejas e insecticidas probados

Se emplearon obreras adultas de *M. beecheii* y *N. perilampoides*, obtenidas del meliponario ubicado en el Tecnológico Nacional de México, campus Conkal, en Conkal, Yucatán, México (21° 04′2 4″ N 89° 31′ 15″ O y 8 m.a.s.n.m.). La recolección se realizó en días soleados con temperaturas superiores a 25 °C. Se capturaron exclusivamente obreras que regresaban a la colonia con polen en sus corbículas, utilizando un aspirador manual, y se agruparon en frascos de plástico de 500 mL. Los frascos utilizados estaban equipados con papel filtro en la base (Whatman grado 1) y una sección de tela de malla de tul de 20 cm^2 en un lateral del frasco para facilitar la ventilación en cuya parte central se insertó un microtubo de centrifuga de 1.5 mL que contenía una solución de sacarosa (sacarosa/agua destilada 1:1) como alimento, disponible *ad libitum*. Después de la recolección, las obreras se mantuvieron en un cuarto oscuro (temperatura: 30 ± 1 °C; HR: 70 ± 2 %) durante 24 h antes del inicio de las pruebas, con el fin de reducir el estrés del confinamiento.

En este estudio se evaluaron dos insecticidas: flonicamid (Beleaf, 500 g/kg; FMC Agroquímica de México) y pimetrozina (Plenum® 50 GS, 500 g/kg; Syngenta Agro), ambos utilizados para el control de insectos succionadores de savia de las familias Aleyrodidae y Aphididae en cultivos hortícolas. Las concentraciones de los insecticidas se seleccionaron siguiendo las recomendaciones de aplicación en campo proporcionadas por los fabricantes para el control de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.). La concentración de flonicamid fue de 250 mg de ingrediente activo (i.a./L) mientras que la de pimetrozina fue de 500 mg i.a./L. Las dosis de los insecticidas se calcularon considerando el volumen de aspersión por hectárea de 500 L utilizado para el control de la mosca blanca en cultivos hortícolas. Todos los experimentos se llevaron a cabo mediante dos vías de exposición: oral y residual.

Efecto en la supervivencia de los insecticidas sobre *M. beecheii* y *N. perilampoides*

Para la exposición oral, las abejas fueron alimentadas con una solución de azúcar contaminada con la dosis respectiva. En frascos de plástico de 500 mL, se colocaron diez abejas con un período de ayuno de dos h para asegurar la ingestión durante el experimento. Posteriormente, se añadió 1 mL de la dieta contaminada en un microtubo de 1.5 mL insertado en los frascos. El grupo control fue alimentado con 1 mL solución azucarada (sacarosa/agua destilada 1:1) sin insecticida.

Para la exposición residual, se emplearon cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro por 2 cm de altura con perforaciones en la tapa para permitir la respiración de las abejas. En el fondo de cada caja se colocó papel filtro de 9 cm de diámetro (Whatman grado 1), al cual se aplicó 1 mL de solución insecticida acuosa a la concentración evaluada o agua destilada para el control. Tras un período de secado de dos h a temperatura ambiente, se añadieron microtubos de 1 mL de alimento sin insecticida (sacarosa/agua destilada 1:1). Luego, se introdujeron diez abejas adultas en cada caja Petri. En ambos tipos de exposición, se registró el número de abejas vivas y muertas en cada unidad experimental (frascos de plástico o cajas Petri) en intervalos de cuatro, ocho y 12 h, después de la exposición a los insecticidas. Se consideró que los individuos estaban muertos si no podían moverse o ponerse de pie. Cada tratamiento se replicó cinco veces, y cada réplica contuvo diez obreras adultas. Todas las unidades experimentales se mantuvieron en un cuarto obscuro a una temperatura de 30 ± 1 °C y una humedad relativa de 70 ± 2 %.

Efectos subletales de los insecticidas en la actividad de caminata y vuelo vertical de *M. beecheii* y *N. perilampoides*

La actividad de caminata se evaluó en una placa de madera con dimensiones de 75 x 30 x 15 cm, la cual estaba equipada con tubos de silicona de 60 cm de longitud acoplados. Las abejas fueron expuestas a las dosis de aplicación recomendada en campo de los insecticidas, tanto por vía oral (dieta contaminada) o exposición residual (residuos secos), como se describió anteriormente. Después de dos h de exposición, los insectos fueron liberados individualmente en un extremo de los tubos de silicona. En el extremo opuesto de los tubos se colocó una lámpara fluorescente de 60 watts y 800 lúmenes, como un estímulo de atracción para las abejas. Treinta segundos antes de comenzar la prueba, se encendió la lámpara, y luego de ese intervalo, se liberaron diez abejas en cada ronda del experimento, por triplicado. Se registró el tiempo que cada abeja tardó en recorrer una distancia de 50 cm hacia

la fuente de luz, y se calculó la velocidad promedio de cada abeja. En los tratamientos control, las abejas recibieron dieta sin insecticida (exposición oral), o fueron expuestas a una superficie tratada con agua destilada (exposición residual).

La actividad de vuelo vertical se realizó en una torre con una altura de 105 cm, la cual estaba abierta en su interior para permitir el libre vuelo de los insectos a través de ella. A una distancia de 10 cm por encima de la torre, se colocó una lámpara fluorescente de 60 watts y 800 lúmenes. Las abejas fueron expuestas a las dosis de aplicación recomendada en campo insecticidas por vía oral (dieta contaminada) o residual (residuos secos). Después de dos h de exposición, se liberaron diez abejas en cada ronda del experimento, realizadas por triplicado. Los insectos se liberaron individualmente en la base de la torre, a una altura de 0 cm, y se les permitió un período de dos minutos para completar el vuelo. Se clasificó el despegue del vuelo de la siguiente manera: (a) ningún vuelo (es decir, la abeja permaneció en la base de la torre), (b) vuelo de hasta 35 cm de altura, (c) vuelo entre 35 y 70 cm de altura, (d) vuelo entre 70 y 105 cm de altura y (e) vuelo alcanzando la fuente de luz a una altura de 120 cm. En los tratamientos control, las abejas recibieron dieta sin insecticida (exposición oral), o fueron expuestas a una superficie tratada con agua destilada (exposición residual).

Análisis estadístico

Todos los experimentos siguieron un diseño completamente al azar. Las curvas de supervivencia se generaron utilizando estimadores de Kaplan-Meier basados en datos de mortalidad observados en intervalos de evaluación de cuatro, ocho y 12 h, después de la exposición a los insecticidas. Las funciones de supervivencia estimadas se compararon con una prueba no paramétrica de Log-Rank (método de Holm-Sidak). Los datos de velocidad de caminata se sometieron a un análisis de varianza. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5 %. Para evaluar la asociación entre el vuelo de las abejas y las altitudes en relación con los tratamientos, se construyeron tablas de contingencia y se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba χ^2 de Pearson ($p<0.05$). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al*., 2018).

RESULTADOS

Tasa de supervivencia de *M. beecheii* y *N. perilampoides*

La exposición oral y residual de *M. beecheii* y *N. perilampoides* al flonicamid y pimetrozina tuvo impacto significativo en la supervivencia (Figura 1). En *M. beecheii*, la exposición oral a los insecticidas resultó en una disminución en la tasa de supervivencia, que osciló entre el 79 % y 89 % a las 12 h (Figura 1a). Sin embargo, no se detectó ningún efecto adverso cuando las abejas fueron expuestas a los insecticidas residualmente (Figura 1b). En *N. perilampoides*, la exposición oral a los insecticidas no tuvo efectos en la tasa de supervivencia (Figura 1c), pero la exposición residual resultó en una disminución de 79 % y 82 % de supervivencia (Figura 1d).

Evaluación de la actividad de caminata de los insecticidas sobre *M. beecheii* y *N. perilampoides*

La exposición oral y residual por dos h de *M. beecheii* y *N. perilampoides* a flonicamid y pimetrozina afectó significativamente la velocidad de caminata (Figura 2). En *M. beecheii*, la exposición oral resultó en una reducción de la velocidad de caminata, con valores de 1.66 ± 0.30 cm/s para flonicamid y 0.96 ± 0.21 cm/s para pimetrozina, en comparación al grupo control (3.79 ± 0.35 cm/s). En exposición residual, la velocidad de caminata fue similar en los tres tratamientos (Figura 2a). En *N. perilampoides*, durante la exposición oral, las abejas expuestas al flonicamid exhibieron una velocidad de caminata más lenta (0.50 ± 0.09 cm/s), mientras que las abejas tratadas con pimetrozina (0.93 ± 0.11 cm/s) mantuvieron una velocidad similar a las abejas del grupo control (1.26 ± 0.13 cm/s). En exposición residual, tanto el flonicamid como la pimetrozina causaron reducción de la velocidad de caminata, con valores de (0.64 ± 0.08 cm/s) y (0.44 ± 0.07 cm/s) respectivamente, comparado con el grupo control (0.97 ± 0.06 cm/s) (Figura 2b).

Evaluación de la actividad de vuelo de los insecticidas sobre *M. beecheii* y *N. perilampoides*

La exposición oral y residual por dos h de *M. beecheii* y *N. perilampoides* a flonicamid y pimetrozina afectó significativamente la capacidad de vuelo (Figura 3). En *M. beecheii*, el 70 % de los individuos no tratados (grupo control) volaron hacia la fuente de luz a una altura de 120 cm durante la exposición oral. En contraste, sólo el 10 % y 0 % de las abejas tratadas con flonicamid y pimetrozina, respectivamente, alcanzaron esa altura (Figura 3a). En exposición residual, ninguno de los insecticidas tuvo efecto sobre la actividad de vuelo (Figura 3b). En *N. perilampoides*, el 70 % de los individuos no tratados (grupo control) volaron hacia la fuente de luz a una altura de 120 cm durante la exposición oral. En contraste, sólo el 6.67 % y 0 % de las abejas tratadas con flonicamid y pimetrozina, respectivamente, alcanzaron esa altura (Figura 3c). En exposición residual, todas las abejas control volaron hacia la fuente de luz a 120 cm, mientras que el 63.33 % de las abejas tratadas con flonicamid mostraron el mismo comportamiento. Sólo el 26.67 % de las abejas tratadas con pimetrozina alcanzaron los 120 cm (Figura 3d).

DISCUSIÓN

La aplicación de insecticidas químicos en los agroecosistemas ha traído consecuencias negativas para especies clave en la polinización, como las abejas sin aguijón (Lima *et al*., 2016; Toledo-Hernández *et al*., 2022). En particular los insecticidas que actúan en el sistema nervioso central representan una seria amenaza para la supervivencia de las abejas sin aguijón (Tomé *et al*., 2015a; Lima *et al*., 2016; Góngora-Gamboa *et al*., 2022). Estos productos suministrados en dosis subletales causan efectos negativos en la locomoción de las abejas a corto plazo (Tomé *et al*., 2015a; Tomé *et al*., 2015b; Piovesan *et al*., 2020). Existen insecticidas químicos que actúan en sitios de acción, como los órganos cordotonales de los insectos, y

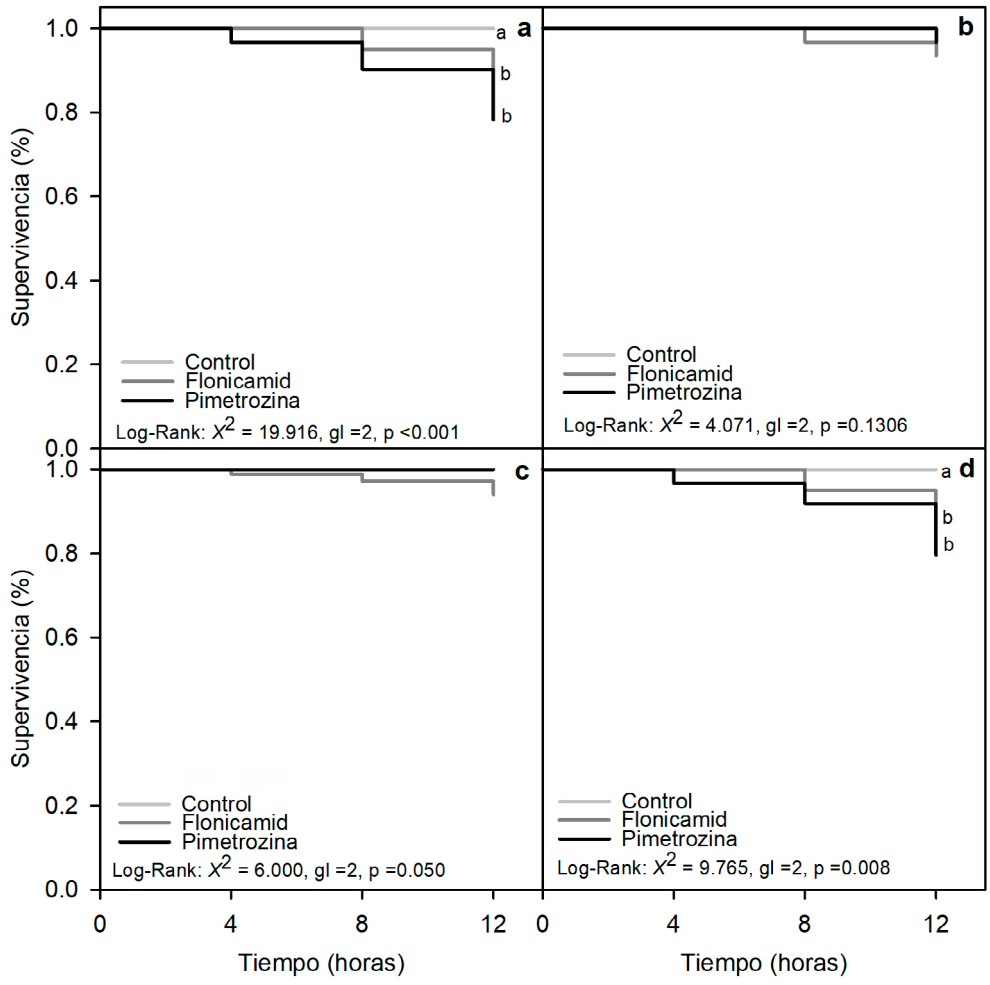


Figura 1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de *M. beecheii* expuestas por vía oral (a) o residual (b) y de *N. perilampoides* expuestas por vía oral (c) o residual (d) a las dosis recomendadas en campo de flonicamid (250 mg i.a/L) y pimetrozina (500 mg i.a/L) después de 4, 8 y 12 h de exposición. Las funciones de supervivencia estimadas se compararon con una prueba no paramétrica de Log-Rank (método de Holm-Sidak). Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos insecticidas se indican con letras diferentes.

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of *M. beecheii* exposed orally (a) or residually (b) and of *N. perilampoides* exposed orally (c) or residually (d) to the recommended field doses of flonicamid (250 mg a.i./L) and pymetrozine (500 mg a.i./L) after 4, 8 and 12 hours of exposure. The estimated survival functions were compared with a nonparametric Log-Rank test (Holm–Sidak method). Significant differences ($p < 0.05$) among insecticide treatments are indicated by different letters.

ese efecto de estos productos no se conoce, pues la mayor parte de los estudios se han hecho usando insecticidas que actúan en el sistema nervioso central. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de dos insecticidas (flonicamid y pimetrozina) que actúan en los órganos cordotonales, en la supervivencia y locomoción de las abejas sin aguijón *M. beecheii* y *N. perilampoides*.

Mediante exposición oral y residual, se observó que la tasa de supervivencia disminuyó ligeramente a las 12 h después de la exposición a dosis de campo. Otros insecticidas como el organofosforado clorpirifós, el neonicotinoide imidacloprid y la spinosina spinosad tienen un impacto mucho mayor en la supervivencia de abejas sin aguijón, incluso en un lapso muy corto de tiempo (Tomé *et al*., 2015b; Leite *et al*., 2021). Al igual que en el presente estudio, se ha observado que el flonicamid y la pimetrozina causan efectos ligeros a moderados en la abeja europea *Apis mellifera* (L.), utilizando concentraciones de 0.25 a 80 mg/L para el flonicamid y de 250 a 300 mg/L para la pimetrozina (Abramson *et al*., 2012; Badawy *et al*., 2014; Meikle y Weiss 2022; Anwar *et al*., 2022).

Aunque algunos insecticidas no presentan efectos letales en las abejas sin aguijón, sí pueden causar efectos subletales, como inhibición de la alimentación y disminución en la capacidad de vuelo (Tomé *et al*., 2015b; Bernardes *et al*., 2017; Pereira *et al*., 2023). En el presente estudio, aunque el flonicamid y pimetrozina no causaron alta mortalidad, se detectaron efectos en la velocidad de caminata y vuelo vertical. En general, se encontró que *N. perilampoides* tuvo efectos más pronunciados que *M. beecheii*. La velocidad de caminata se redujo significativamente, además de disminuir la capaci-

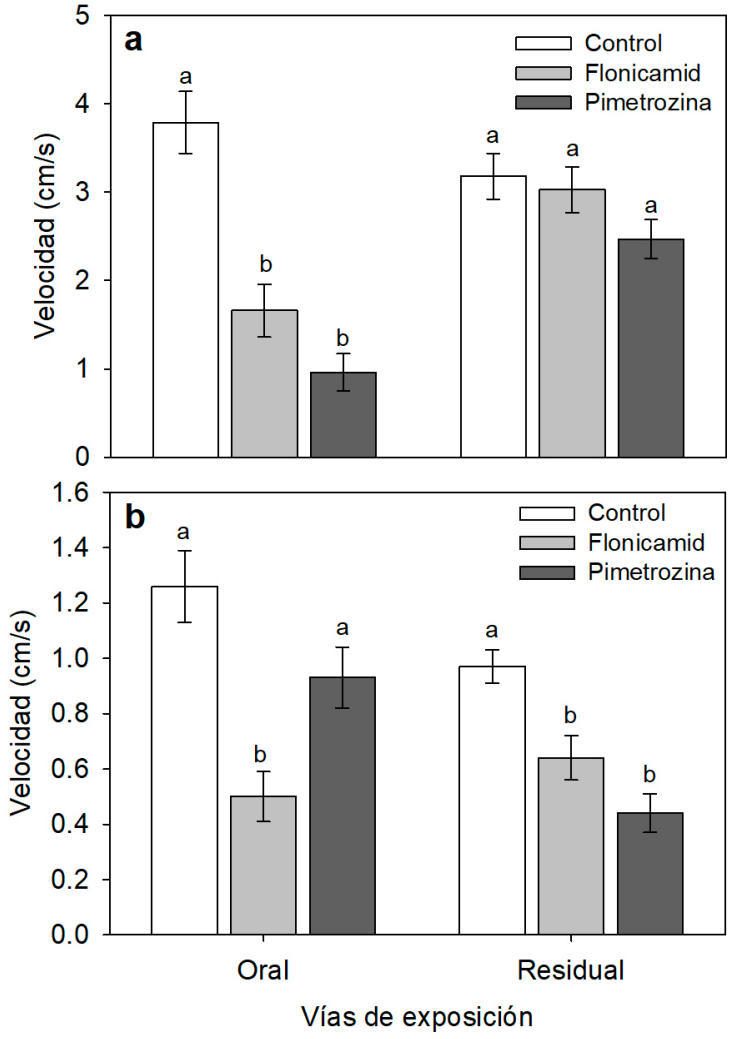


Figura 2. Efecto de flonicamid (250 mg i.a/L) y pimetrozina (500 mg i.a/L) sobre la velocidad de caminata de *M. beecheii* (a) y *N. perilampoides* (b) después de dos h de exposición oral y residual. Medias ± error estándar con letra distinta dentro de las barras indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).
Figure 2. Effect of flonicamid (250 mg a.i./L) and pymetrozine (500 mg a.i./L) on the walking speed of *M. beecheii* (a) and *N. perilampoides* (b) after two hours of oral and residual exposure. Means ± standard error with different letters within the bars indicate statistical significance (Tukey, $p < 0.05$).

dad de vuelo vertical. Estos efectos en la locomoción de *M. beecheii* y *N. perilampoides* pueden ser debido al mecanismo de acción de estos insecticidas, sobre los órganos cordotonales de los insectos, ya que los órganos cordotonales son receptores sensoriales que controlan la locomoción (Field y Matheson, 1998; Yack, 2004; Kavlie y Albert, 2013). El flonicamid es una piridina carboxamida e interrumpe la actividad de la enzima nicotinamidasa, provocando la sobreactivación de los receptores del canal de potencial transitorio tipo vaniloide (TRPV) en los órganos cordotonales (Qiao *et al*., 2022). En contraste, pimetrozina, una piridina azometina, actúa directamente sobre los canales TRPV, causando parálisis (Spalthoff *et al*., 2022).

La exposición de *M. beecheii* y *N. perilampoides* a flonicamid y pimetrozina resultó en una disminución significativa de la velocidad de caminata y la actividad de vuelo. Estos efectos sugieren que estas abejas podrían enfrentar serias dificultades para pecorear de manera eficaz y podría resultar en una menor polinización de los cultivos, afectando negativamente la producción agrícola. *Melipona beecheii* y *N. perilampoides* son dos especies de abejas sin aguijón que pertenecen a diferentes géneros dentro de la tribu Meliponini, lo que implica variaciones en su biología, por ejemplo, *M. beecheii* es más grande y forma colonias de 800 a 1500 individuos, anidando principalmente en cavidades de árboles en áreas preservadas (Quezada-Euán, 2018). En contraste,

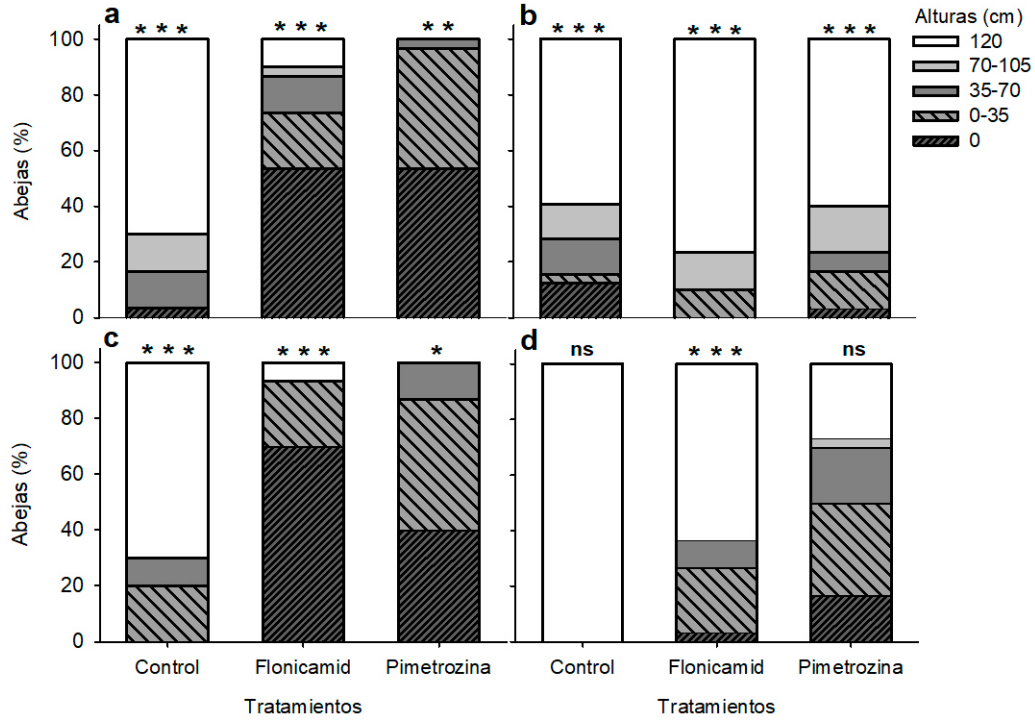


Figura 3. Efecto de flonicamid (250 mg i.a/L) y pimetrozina (500 mg i.a/L) sobre el porcentaje de adultos de *M. beecheii* expuestas por vía oral (a) o residual (b) y *N. perilampoides* expuestas por vía oral (c) o residual (d) que aterrizaron en diferentes niveles de alturas después de dos h. La prueba de chi-cuadrado de Pearson indica significación estadística indicada como (***= $p < 0.0001$; **= $p < 0.005$; *= < 0.05; ns = diferencia no significativa).

Figure 3. Effect of flonicamid (250 mg a.i./L) and pymetrozine (500 mg a.i./L) on the flight activity of *M. beecheii* exposed orally (a) or residually (b), and *N. perilampoides* exposed orally (c) or residually (d) that landed at different height levels after two hours. Pearson's χ^2 test indicates a significant difference (*** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; n.s., statistically not significant).

N. perilampoides es más pequeña y tiene colonias de 700 a 1200 individuos. Esta abeja anida en árboles vivos, pero también se adapta a ambientes urbanos, utilizando grietas y hendiduras de edificios para establecer sus colonias (May-Itzá *et al*., 2021). Estas caracteristicas podrían influir en sus capacidades de adaptación y resistencia a estresores como los insecticidas.

Como los efectos fueron más pronunciados en *N. perilampoides*, esta especie podría ser especialmente vulnerable en entornos donde se usan estos insecticidas. Sin embargo, es crucial realizar estudios sobre los efectos de pimetrozina y flonicamid en condiciones de campo e invernadero. Esto permitirá investigar los impactos de estos productos en escenarios más realistas.

CONCLUSIONES

Los insecticidas flonicamid y pimetrozina causaron disminución ligera en la tasa de supervivencia de *M. beecheii* y *N. perilampoides* a las 12 h de exposición por ambas rutas, oral y residual. Después de dos h de exposición, ambos insecticidas provocaron reducción significativa en la velocidad de caminata y la actividad de vuelo vertical en ambas especies de abejas, particularmente en exposición oral. Estos efectos fueron más pronunciados en *N. perilampoides*que en *M. beecheii*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el apoyo financiero al proyecto 21341.24-P titulado "Evaluación de insecticidas sistémicos para el manejo del complejo chicharritas-achaparramiento en maíz y su compatibilidad con abejas nativas".

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abramson, C.I., Sokolowski, M.B.C., Brown, E.A. y Pilard, S. 2012. The effect of pymetrozine (Plenum WG-50®) on proboscis extension conditioning in honey bees (*Apis mellifera*: Hybrid var. Buckfast). Ecotoxicology and Environmental Safety 78, 287-295.

Anwar, M.I., Sadiq, N., Aljedani, D.M., Iqbal, N., Saeed, S., Khan, H.A.A., Naeem-Ullah, U., Aslam, H.M.F., Ghramh, H.A. y Khan, K.A. 2022. Toxicity of different insecticides against the dwarf honey bee, *Apis florea* Fabricius (Hymenoptera: Apidae). Journal of King Saud University-Science 34, 101712.

Badawy, M.E.I., Nasr, H.M. y Rabea, E.I. 2014. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. Apidologie 46, 177-193.

Bernardes, R.C., Botina, L.L., Araújo, R.D.S., Guedes, R.N.C., Martins, G.F. y Lima, M.A.P. 2022. Artificial intelligence-aided meta-analysis of toxicological assessment of agrochemicals in bees. Frontier in Ecology and Evolution. 10:845608.

Bernardes, R.C., Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Guedes, R.N.C. y Lima, M.A.P. 2017. Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. Apidologie 48:275-285.

Caro, A., Moo-Valle, H., Alfaro, R. y Quezada-Euán, J.J.G. 2017. Pollination services of africanized honey bees and native *Melipona beecheii* to buzz-pollinated annatto (*Bixa orellana* L.) in the neotropics. Agricultural and Forest Entomol. 19, 274.

Cham, K.O., Nocelli, R.C.F., Borges, L.O., Viana-Silva, F.E.C., Tonelli, C.A.M., Menezes, O.M.C., Rosa-Fontana, A.S., Blochtein, B., Freitas, B.M., Pires, C.S.S., Oliveira, F.F., Contrera, F.A.L., Torezani, K.R.S., Ribeiro, M.F., Siqueira, M.A.L. y Rocha, M.C.L.S.A. 2018. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. Environmental Entomology, 20, 1-13.

Devi, P.I., Manjula, M. y Bhavani, R.V. 2022. Agrochemicals, environment, and human health. Annual review of environment and resources. 47:399-421.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. 2018. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T. y Fell, R. 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. Environmrntal Toxicology Chemestry. 33, 719-731.

FAOSTAT (2021) FAOSTAT. Consultado el 28 de marzo 2024. Disponible en: https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP.

Field, L.H. y Matheson, T. 1998. Chordotonal organs of insects. Advances in Insect Physiology. 27:1-230.

Góngora-Gamboa, C., Ruiz-Sánchez, E., Ballina-Gómez, H., González-Moreno, A. y Zamora-Bustillos, R. 2022. Survival rate of the neotropical stingless bees *Nannotrigona perilampoides* and *Frieseomelitta nigra* after exposure to five selected insecticides, under controlled conditions. Insects 13(10):961.

González-Acereto, J.A., Quezada-Euán, J.J.G. y Medina-Medina, L.A. 2006. New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. Journal of Apicultural Research. 45:234-239.

Goulson, D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology. 50, 977-987.

Huang, Z., Sun, Z., Liu, J., Ju, X., Xia, H., Yang, Y., Chen, K. y Qiang, W. 2023. Insect transient receptor potential vanilloid channels as potential targets of insecticides. Developmental & Comparative Immunology. 148, 104899.

Kavlie, R.G. y Albert, J.T. 2013. Chordotonal organs. Current Biology. 23,9 R334.

Leite, D.T., Sampaio, R.B., Chambó, E.D., Aguiar, C.M.L., de Godoy, M.S. y de Carvalho, C.A.L. 2021. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. International Journal of Tropical Insect Science. 42, 435-443.

Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E. y Guedes, R.N.C. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. Journal of Comparative Physiology A. 202, 733-747.

Maienfisch, P. 2019. Selective feeding blockers: Pymetrozine, flonicamid, and pyrifluquinazon. En: Modern Crop Protection Compounds. Jeschke P., Witschel M., Krämer W. y Schirmer U. (eds.). pp. 1501-1526. John Wiley & Sons, Ltd, Weinheim, Germany.

May-Itzá, W.J., Araujo-Freitas, C., Paxton, R.J., Moo-Valle, H., Medina-Medina, L.A., y Quezada-Euán, J.J.G. 2021. Stingless bees in urban areas: low body size and high frequency of diploid males at mating congregations of *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera: Meliponini) in Mérida, Yucatán, México. Apidologie 52, 755-766.

Meikle, W.G. y Weiss, M. 2022. Field and cage studies show no effects of exposure to flonicamid on honey bees at field-relevant concentrations. Insects, 13, 845.

Nesterov, A., Spalthoff, C., Kandasamy, R., Katana, R., Rankl, N.B., Andrés, M., Jähde, P., Dorsch, J.A., Stam, L.F., Braun, F.-J., Warren, B., Salgado, V.L. y Göpfert, M.C. 2015. TRP channels in insect stretch receptors as insecticide targets. Neuron 86, 665-671.

Pereira, R.C., Júnior, J.O.L.V., Barcelos, J.V.P.L., Peçanha, L.S., França, T.A., Mendonça, L.V.P., da Silva, W.R., Samuels, R.I. y Silva, G.A. 2023. The stingless bee *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apidae) is at risk from a range of insecticides via direct ingestion and trophallactic exchanges. Pest Management Science. 80, 2188-2198.

Piovesan, B., Padilha, A.C., Morais, M.C., Botton, M., Grützmacher, A.D. y Zotti, M.J. 2020. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragoniscafiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). Environmental Science and Pollution Research 27:42472-42480.

Qiao, X., Zhang, X., Zhou, Z., Guo, L., Wu, W., Ma, S., Zhang, X., Montell, C. y Huang, J. 2022. An insecticide target in mechanoreceptor neurons. Science Advances. 8, eabq3132.

Quezada-Euán, J.J.G. 2018. Stingless bees of Mexico the biology, management and conservation of an ancient heritage. New York, NY: Springer.

Real-Luna, N., Rivera-Hernández, J.E., Alcántara-Salinas, G., Rojas-Malavasi, G., Morales-Vargas, A.P. y Pérez-Sato, J.A. 2022. Las abejas sin aguijón (Tribu Meliponini) en los agroecosistemas de América Latina. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 13 (2).

Salgado, V.L. 2017. Insect TRP channels as targets for insecticides and repellents. Journal of Pesticide Science. 42(1), 1-6.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar, R.D., Dar, O.I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R. y Thukral, A.K. 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences. 1:1446.

Silviter, H., Bailes, E.J., Martin, C.D., Oliver, T.R., Koricheva, J., Leadbeater, E. y Brown, M.J.F. 2021. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. Nature 596, 389-392.

Spalthoff, C., Salgado, V.L., Theis, M., Geurten, B.R.H. y Göpfert, M.C. 2022. Flonicamid metabolite 4-trifluoromethylnicotinamide is a chordotonal organ modulator insecticide. Pest Management Science. 78, 11 4802-4808.

Toledo-Hernández, E., Peña-Chora, G., Hernández-Velázquez, V.M., Lormendez, C.C., Toribio-Jiménez, J., Romero-Ramírez, Y. y León-Rodríguez, R. 2022. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. Apidologie 53:8.

Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Martins, G.F. y Guedes, R.N.C. 2015a. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. Chemosphere 124:103-109.

Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Corrêa, A.S., Gontijo, L.M., Martins, G.F. y Guedes, R.N.C. 2015b. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. Annals of Applied Biology. 167:186-196.

Yack, J.E. 2004. The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. Microscopy Research Technique. 63:315-337.

Zhang, L., Yan, C., Guo, Q., Zhang, J. y Ruiz-Menjivar, J. 2018. The impact of agricultural chemical inputs on environment: global evidence from informetrics analysis and visualization. International Journal of Low-Carbon Technologies. 13:338-352.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Diversidad de parasitoides (Hymenoptera) en diferentes estados sucesionales de la selva mediana subcaducifolia

Diversity of parasitoids (Hymenoptera) of different successional stages in a dry semi-deciduous tropical forest

Walther Torres-Cab[1], Esaú Ruíz-Sánchez[2], Gabriel Antonio Lugo García[3], Alejandra González-Moreno[4]*

[1] Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México.
[2] Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México.
[3] Universidad Autónoma de Sinaloa, Colegio de Ciencias agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Calle 16 y Av. Japaraqui 81110, Juan Jose Ríos, Ahome, Sinaloa, México.
[4] Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México.

ABSTRACT

This work aimed to compare the diversity of parasitoids families in three successional stages (5, 25 and 60 years), from a dry semideciduous tropical forest in Mexico. It was proposed due to the limited knowledge about their diversity, their high richness and its importance as regulators of phytophages. A total of 10 Malaise traps were placed, from August to December 2016; within each successional stage at the Kaxil-Kiuic Biocultural Ecological Reserve, Mexico. As many as 23,435 specimens of hymenopterans were collected, distributed in 33 families were collected; Braconidae, Diapridae, Scelionidae and Bethylidae were the most abundant families. Total estimated richness was calculated, without differences for the different successional stages according to the non-parametric indices, CHAO 1 and ACE, but with highest alpha diversity in the 25-years-old vegetation, which can be explained by the mean disturbance theory. Beta diversity showed high numbers of families shared between the different stages of the vegetation. In conclusion, the high numbers of families found demonstrate the importance of dry semideciduous tropical forest of Yucatan in maintaining parasitoid diversity, specially in intermediate successional stages of dry semi-deciduous tropical forest

Keywords: Richness, Natural enemies; Vegetation age; Neotropic.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo comparar la diversidad de familias de parasitoides en tres estados sucesionales (5, 25 y 60 años), de una selva mediana subcaducifolia de México. Esto, debido al escaso conocimiento sobre su diversidad, su riqueza de especies y su importancia como reguladores de fitófagos. Se colocaron un total de 10 trampas Malaise, de Agosto a Diciembre 2016; dentro de cada etapa sucesional de la vegetación de la reserva ecológica biocultural Kaxil-Kiuic, México. Se recolectaron 23 435 ejemplares de himenópteros distribuidos en 33 familias, siendo Braconidae, Diapridae, Scelionidae y Bethylidae las más abundantes. La riqueza total estimada fue calculada, sin diferencias para los diferentes estados de sucesión, según los intervalos del confianza al 95 % de los índices no paramétricos CHAO 1 y ACE. Pero con una mayor diversidad alfa en la vegetación de 25 años; lo que puede explicarse con la teoría de disturbio medio. La diversidad beta mostró números altos de familias compartidas entre los diferentes estados sucesionales de la vegetación. En conclusión, los números de familias encontradas, demuestra la importancia de la selva mediana subcaducifolia de Yucatán en el mantenimiento de la diversidad de parasitoides, especialmente estados sucecionales intermedios de la selva mediana subcaducifolia.

Palabras clave: Riqueza; Enemigos naturales; Edad de vegetación; Neotropico.

INTRODUCCIÓN

La vertiginosa pérdida de la diversidad ha llevado a que uno de los objetivos de la Agenda 2030 considere análisis detallados del estado actual de la diversidad de seres vivos y los factores que la afectan. La mayoría de estos estudios ha priorizado el conocimiento de plantas y vertebrados, sin considerar a los insectos (Carignan y Villard, 2002), pese a que representan la mayor proporción de la riqueza global de especies (Fernández, 2022). Dentro de estos, adquieren relevancia los parasitoides del orden Hymenoptera, ya que en términos de diversidad, son importantes por su elevado número de especies (Forbes *et al*., 2018), con 1 107 487 de especies estimadas a nivel mundial, y con poco más de 33,640 especies para el Neotropico (Fernández, 2022).

Además de su importancia en términos de riqueza, los parasitoides son importantes como enemigos naturales de insectos, ya que se desarrollan en su etapa larval dentro o sobre otros artrópodos, frecuentemente fitófagos, a los cuales, matan al final del proceso; por lo que también son importantes económicamente, al poder utilizarse en el control biológico de plagas (Godfray, 1994). Pese a la importancia del grupo, se desconocen los patrones de diversidad, ya que la mayoría de las investigaciones se enfocan a la interacción hospedero-parasitoide o al estudio de diversidad de alguna familia específica, por ejemplo, Braconidae, Chalcididae, Ichneumonidae, entre otras (González-Maldonado, 2020; Ramírez-Ahuja *et al*., 2020; Serrano-Domínguez *et al*., 2021;

*Autor para correspondecia: Alejandra González Moreno,
Correo-e: alejandra.gm@conkal.tecnm.mx
Recibido: 9 de junio de 2024
Aceptado: 9 de septiembre de 2024
Publicado: 17 de octubre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2354

Jacobo-Macías *et al*., 2022; Villa-Ayala *et al*., 2022). Particularmente para la Península de Yucatán, se han desarrollado estudios sobre sistemática y diversidad de parasitoides (ej. González-Moreno *et al*., 2012; 2015a; 2015b; 2018; González-Moreno y Bordera, 2011; 2012; Chan-Canché *et al*., 2020; Cutis *et al*., 2022; Flota *et al*., 2024).

Algunos factores que pueden afectar la diversidad de insectos son la estructura y edad de la vegetación; se ha demostrado la relación inversa entre el estado sucesional del bosque y la diversidad de insectos, principalmente de organismos fitófagos (Díaz-Álvarez *et al*., 2023). En contraste, otros autores han demostrado que la diversidad de fitófagos es mayor en estados de sucesión avanzada (Byriel *et al*., 2023; Thomas, 2023). Además de estos resultados contrastantes, hay pocos estudios de cómo la sucesión de la vegetación afecta grandes grupos de insectos, como Diptera e Hymenoptera (Thomas, 2023).

Recientemente, se demostró que la edad de la vegetación, en niveles intermedios de sucesión, favorece una mayor diversidad de especies de parasitoides de la familia de Ichneumonidae, en comparación con selvas de sucesión temprana o con más de 60 años (González-Moreno *et al*., 2023); no obstante, se desconoce si estos patrones de diversidad que se reflejan a nivel de especie, también se presentan a nivel de familia. Por lo que en este trabajo se analizó la diversidad de familias de parasitoides del Orden Hymenoptera, en tres estados sucesionales de la selva mediana subcaducifolia. Se partió de la hipótesis que a nivel familia, los patrones de riqueza y diversidad asociados a estados sucesionales, se comportarán de manera diferente que a nivel de especie; ya que al analizar altos niveles taxonómicos (ej. familias), la riqueza y diversidad será mayor en la vegetación más vieja, debido a su estructura más compleja, lo que favorece mayor riqueza de fitófagos (Byriel *et al*., 2023; Thomas, 2023) y por consiguiente de parasitoides; así mismo, se espera que la composición de comunidades sea diferente para cada estado sucesional, principalmente por la familia que domine cada edad de vegetación. Esta información será relevante ya que genera no sólo conocimiento sobre la diversidad de parasitoides del bosque subcaducifolio, sino también, cuál es la composición de familias en cada estado sucesional de los ecosistemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente trabajo se realizó en la reserva ecológica biocultural Kaxil-Kiuic, localizada en el municipio de Oxkutzcab, Yucatán, entre los paralelos 20 º 21 ' y 19 º 58 ' N y 89 º 22 ' y 89 º 46 ' W a 33 msnm. El clima es cálido-subhúmedo, con lluvias en verano y un período de secas de noviembre a abril, con temperatura media anual de 26.3 °C y una precipitación pluvial media anual con rangos entre 1000 y 1100 mm. La humedad relativa en el mes de marzo es del 66 % y en diciembre de 89 %. Los vientos dominantes proceden del sureste. La flora se clasifica como selva mediana subcaducifolia con vegetación secundaria (Hernández-Stefanoni *et. al*., 2014).

Metodología

En la selva mediana subcaducifolia, se seleccionaron tres parches de vegetación con diferente estado sucesional: 5 a 9 años, 10 a 25 años, más de 60 años; los sitios fueron seleccionados considerando la caracterización estructural y de edad realizada por estudios previos (Hernández-Stefanoni *et al*., 2014). En cada sitio se colocaron, siguiendo un diseño completamente al azar, 10 trampas Malaise ampliamente utilizadas en programas de monitoreo de parasitoides (Chan-Canché *et al*., 2020). Las trampas funcionaron ininterrumpidamente durante la temporada de lluvias de agosto a diciembre de 2016, ya que son los meses en los que se han registrado picos de abundancia de parasitoides en la región (González-Moreno y Bordera, 2012; González-Moreno *et al*., 2015a; González-Moreno *et al*., 2018), con reposición de los botes colectores cada quince días.

Las muestras recolectadas en alcohol etílico al 70 % fueron llevadas al Laboratorio del Instituto Tecnológico de Conkal, donde fueron procesadas según las técnicas curatoriales convencionales. El material colectado fue identificado y clasificado a nivel de familia utilizando claves taxonómicas de Goulet y Huber (1993) y Gibson *et al*. (1997). Los ejemplares se depositaron en la colección entomológica del Instituto Tecnológico de Conkal.

Análisis de datos

Se realizaron curvas de acumulación, utilizando los estimadores no paramétricos de riqueza de especies el ACE y Chao 1, que consideran la abundancia de las muestras, para determinar el esfuerzo de muestreo (Magurran, 2004). La riqueza de familias de parasitoides entre las diferentes edades de la vegetación fue comparada con un análisis de rarefacción, con el software EcoSim700, con límites de confianza al 95 %. La diferencia en la abundancia de parasitoides entre los sitios se analizó con un análisis de varianza del número de individuos de las familias más abundantes, posteriormente se realizó una prueba de Tukey para determinar diferencias entre las medias de los grupos. De igual forma se analizaron las comunidades de parasitoides entre los diferentes sitios, construyendo curvas de Whittaker. Para calcular la diversidad alfa se utilizó el índice de Simpson, que se basa en el número de taxones dominantes. Para calcular la diversidad beta se hizo un análisis de similitud y se usaron diagramas de Venn para mostrar las especies compartidas entre sitios (Magurran, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron 23 435 himenópteros parasitoides, representados por 9 superfamilias: Chalcidoidea, Chrysidoidea, Cynipoidea, Ceraphronoidea, Ichneumonoidea, Proctotrupoidea, Platygastroidea, Vespoidea, y Evanioidea. Las superfamilias más abundantes fueron Ichneumonoidea y Chalcidoidea con 7 422 (31.7 %) y 5 015 (21.4 %) ejemplares, respectivamente. Estos resultados son una sustancial contribución al conocimiento de la diversidad y composición de himenópteros

parasitoides presentes en diferentes edades de vegetación de la selva mediada subcaducifolia. La superfamilia Ichneumonoidea, ha sido reportada comúnmente como abundante en otros estudios (Klopfstein *et al*., 2019; Chan-Canche *et al*., 2020; Polaszek y Vilhemsen, 2023), esto se debe a su gran número de especies, además de estar presente en diversos hábitats, por la variedad de estrategias de parasitoidismo y plasticidad que poseen (Quicke, 2015).

Riqueza de familias

La riqueza de familias fue de 33, coincidiendo con el valor estimado de la riqueza, basado en los estimadores no paramétricos Chao 1 (33) y ACE (33), lo que significa que se recolectó el 100 % de la riqueza total estimada para el área. Estos valores se alcanzaron a partir de la colecta seis, que equivale a tres meses de muestreo (Figura 1). El haber alcanzado el 100 % de las familias estimadas para el sitio de estudio, se debe a que con un muestreo extensivo como éste, con 30 trampas Malaise, se recolecte la totalidad de familias del sitio, sin llegar a la totalidad de especies.

Con relación a la riqueza de familias se observó que no existen diferencias en el número de familias de parasitoides de los fragmentos de selva de diferente edad sucesional, de acuerdo con el análisis de rarefacción (Figura 2). El no haber diferencias probablemente se deba a que es altamente probable recolectar a ejemplares representantes de las familias, al ser éste un nivel taxonómico alto. Sin embargo, se recolectaron dos familias más, que las 31 familias registradas para la región (Chan-Canche *et al*., 2020).

Abundancia de familias

Las familias más abundantes fueron Braconidae, Scelionidae, Bethylidae y Diapridae (Figura 3), que son especialmente

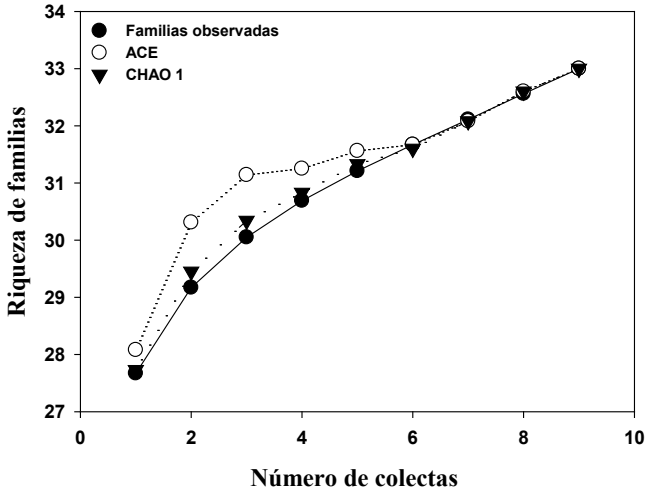


Figura 1. Curva de acumulación de parasitoides (Hymnoptera: Parasitica) en los tres estados sucesionales de la selva mediana subcaducifolia para las familias colectadas con trampas Malaise.
Figure 1. Accumulation curves of parasitoids (Hymenoptera: Parasitica) in the three sucessional stages of dry semideciduos forest for families collected in the Malaise traps.

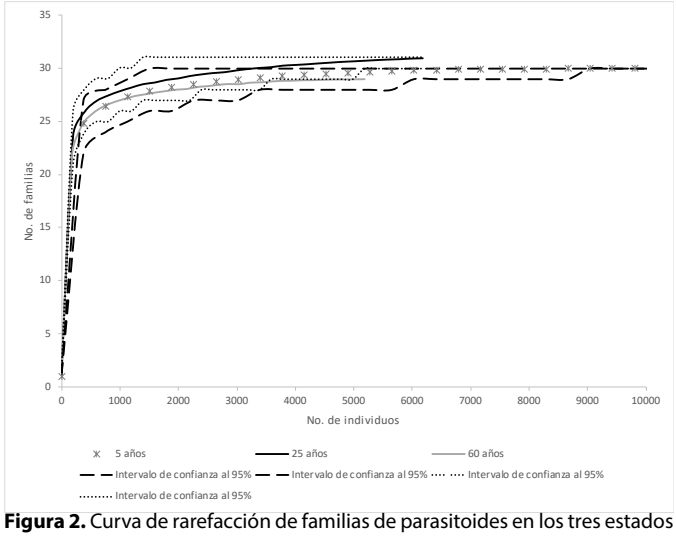


Figura 2. Curva de rarefacción de familias de parasitoides en los tres estados sucesionales de la selva mediana subcaducifolia, el esfuerzo de muestreo estandarizado fue de 5178 individuos.
Figure 2. Rarefaction curve of families of parasitoids in the three sucessional stages of dry semideciduos tropical forest, the standarized sampling effort which was 5178 individuals.

ricas en especies (Fernández, 2022), lo que aumenta la probabilidad de que sus especies puedan colonizar diferentes tipos de vegetación. Braconidae que destacó por su riqueza y abundancia, es la segunda familia del orden Hymenoptera con mayor riqueza y alberga géneros más grandes, principalmente con distribución cerca del ecuador (Quicke, 2015; Sharkey *et al*., 2023).

Con respecto a las otras familias más abundantes, también se caracterizan por el alto número de especies conocidas en el Neotrópico, con 3 000, 2 200 y 2 300 especies, respectivamente. Así mismo, Bethylidae es una familia gregaria (Fernández y Sharkey, 2006), por lo que es probable capturar altos números de individuos. Cabe resaltar que el 33 % de los Diapriidae estuvieron en la vegetación de 60 años, probablemente porque se encuentran conmunmente en habitats húmedos y áreas sombrías (Fernández y Sharkey, 2006), por lo que es probable que una selva con estructura de la vegetación más cerrada sea más atractiva para estos parasitoides.

La mayoría de las familias encontradas fueron más abundantes en la vegetación de 5 años, aunque sólo las familias Chalcididae, Braconidae y Pteromalidae fueron significativamente más abundantes en la vegetación de 5 años que en las otras edades de acuerdo a la comparación de medias (Tabla 1). Las familias Eucharitidae y Eupelmidae fueron más abundantes en un 54 % y 45 %, respectivamente, en la vegetación de 25 años; y en la vegetación de 60 años, la familia, Tanaostigmatidae, fue la única que tuvo el mayor número de individuos (Figura 3). También se registra por primera vez para Yucatán la familia Tetracampidae.

En este trabajo, la vegetación de 5 años fue la que presentó la mayor abundancia de varias familias de parasitoides, con relación a la vegetación de mayor edad. Esto coincide con lo registrado en la literatura, selvas en estados

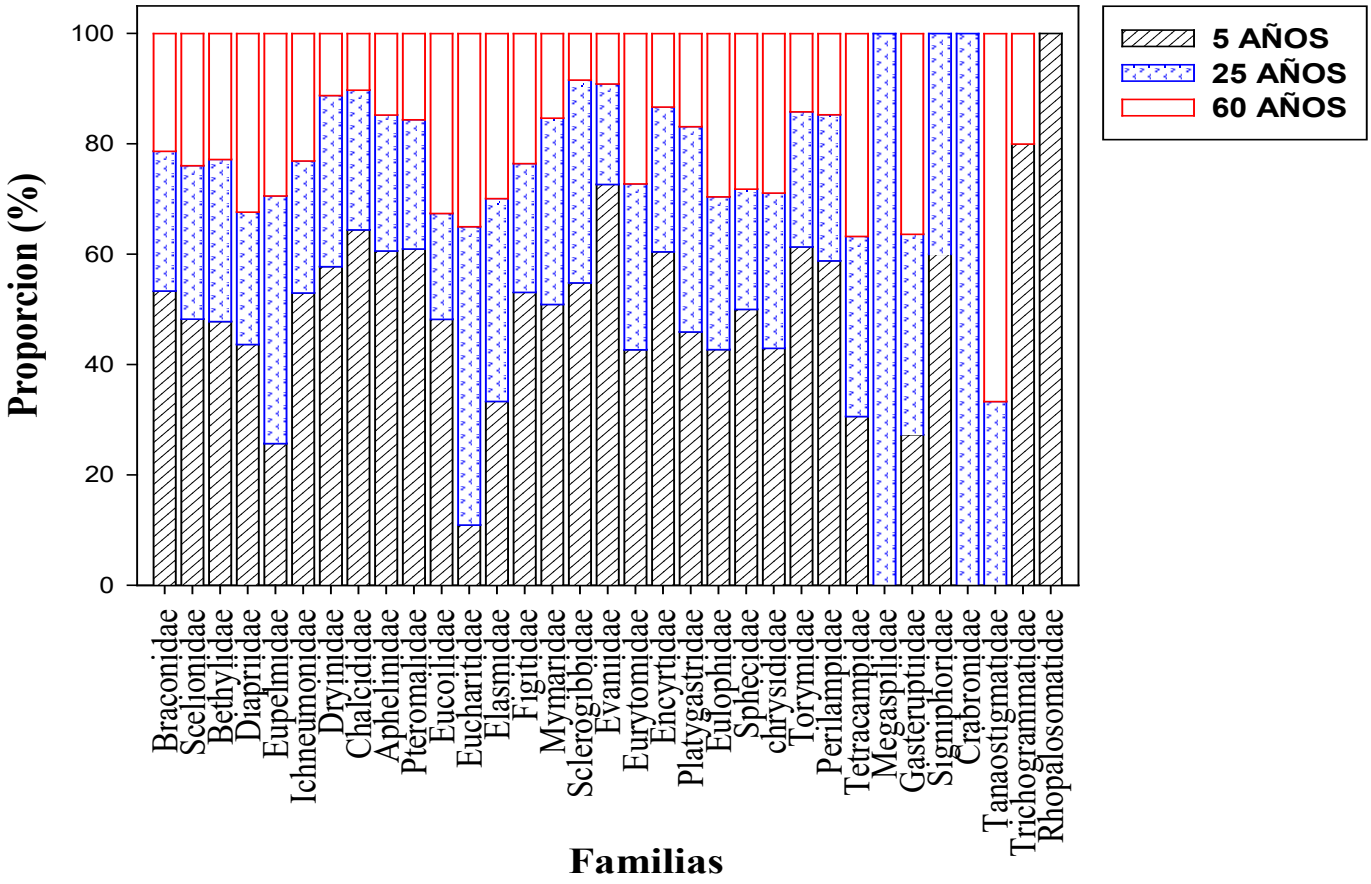


Figura 3. Distribución proporcional de familias de himenópteros parasitoides colectados con trampas Malaise en tres edades de la Selva mediana subcaducifolia.
Figure 3. Relative abundances of hymenopteran parsitoids collected with Malaise traps in three succesional stages of dry semi-deciduous tropical forest.

tempranos de sucesión, como los remanentes de 5 años de nuestros sitios, tendrán comunidades de parasitoides con altos valores de abundancia sólo para algunas familias, lo que resulta en comunidades poco diversas (Díaz-Álvarez *et al*., 2023; González-Moreno *et al*., 2023). Otro factor que pudo influir fue el tipo de trampa utilizada, ya que la trampa Malaise tiene una altura de captura que va desde el nivel de suelo hasta los 2 metros, por lo que es probable, que selvas con menor edad, tengan arboles más jóvenes, menos altos, y la altura en la que vuelan los parasitoides buscando sus hospederos, esté dentro del rango de captura de las Malaise, lo cual disminuye su eficiencia de captura en vegetación con mayor sucesión, con una estructura más cerrada y árboles más grandes, donde es probable que los parasitoides vuelen a mayor altura y queden fuera del rango de acción de la trampa. Además de que se ha comprobado que la altura en la que se coloca la Malaise, influye en la captura de algunas familias de parasitoides, tal es el caso de que las trampas colocadas a nivel del suelo favorecen la captura de Bethylidae, Diapriidae e Ichneumonidae (Chan-Canché *et al*., 2020), que fueron las familias más abundantes en este trabajo.

Tabla 1. Media de la abundancia de las familias con más de 500 individuos recolectados con trampa Malaise en diferentes edades de una selva mediana subcaducifolia, Yucatán, México.
Table 1. Mean abundance of families with 500 or more individuals collected with Malaise traps in dry semi-deciduous tropical forest fragments of different ages, Yucatan, Mexico.

Familias Hymenoptera	5-9 años	10-25 años	> 60 años
		Media	
Braconidae	315.20±0.25a	14.80±0.10 b	126.00±0.11b
Diapridae	123.40 ±0.60 a	67.80± 0.51b	91.50±0.58 ab
Scelionidae	132.00± 0.80a	76.20± 0.71ab	65.50±0.50 b
Bethylidae	115.20±0.29a	70.90± 0.22ab	55.00±0.19 b
Eupelmidae	27.50± 0.33b	48.10± 0.61a	31.50± 0.55ab
Aphelinidae	47.20±0.57a	19.20± 0.33ab	11.50± 0.28b
Chalcididae	49.60± 0.50a	19.50± 0.32b	7.90± 0.25b
Eucolidae	32.40±0.95 a	19.20±0.44 b	21.90± 0.35ab
Pteromalidae	39.00±0.87 a	15.00±0.83 b	10.00± 0.73b
Drynididae	36.50±0.79a	19.60± 0.61ab	7.10± 0.55b

Medias ± error estándar, letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey P ≤ 0.05). Mean ± standard error, different literals in the same row indicate significant differences (Tukey P ≤ 0.05).

Estructura de comunidades

La estructura de comunidades de parasitoides fue similar en las tres edades sucesionales, sin embargo, considerando la pendiente de la curva, la vegetación de 25 años tiene mayor equidad que las otras edades de la vegetación; además cabe resaltar que tanto para la selva de 5 y 25 años, domina la familia, Braconidae; por el contrario en la edad sucecional

de 60 años, además de Braconidae, Diapridae, Scelionidae y Bethylidae tienen rangos altos de abundancia (Figura 4).

Diversidad alfa y beta

La diversidad alfa de familias de parasitoides fue mayor en la vegetación de 25 años (D = 9.31; 8.12, 8.60), con diferencias significativas, considerando los intervalos de confianza al 95 %, con la diversidad de la de vegetación sucesional de 5 años (D = 8.35; 8.12, 8.60) y 60 años (D = 8.17; 7.88, 8.47). Estas diferencias encontradas en las diferentes edades de la vegetación, coincide con varios autores que han demostrado que la edad de la vegetación puede afectar de forma positiva las poblaciones de herbívoros (Byriel *et al*., 2023; Díaz-Álvarez *et al*., 2023; Thomas, 2023) y dado que los parasitoides son densodependientes de sus hospederos, es de esperarse que también presenten el mismo patrón de afectación.

Con relación a la estructura de comunidades, la pendiente de la curva en la vegetación de 25 años sugiere una mayor equidad dentro de estas comunidades de parasitoides. Estos resultados son reforzados con los índices de diversidad alfa, que fueron más altos en esta vegetación con un estado de sucesión intermedia, comparada con la vegetación de edad temprana (5 años) o de estados sucesionales más avanzados (60 años). Estos resultados pueden explicarse con la Hipótesis de la perturbación media, que explica que la diversidad puede ser mayor en sitios donde la perturbación no es muy frecuente ni muy intensa, comparada con sitios no perturbados o con perturbación intensa (Speight *et al*., 2008). Se ha observado que los ecosistemas heterogéneos albergan más poblaciones de parasitoides reguladores de poblaciones de insectos fitófagos, pues existe una correlación positiva entre la diversidad de parasitoides y la diversidad vegetal (Wan *et al*., 2020; Guo *et al*., 2021; González-Moreno *et al*., 2023); y la arquitectónica o tipo de inflorescencias de las plantas (Fagundes *et al*., 2020; Zu *et al*., 2020).

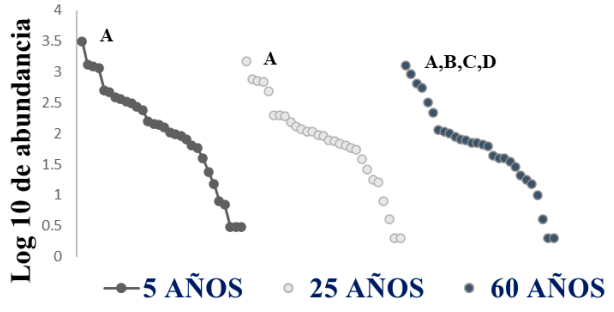


Figura 4. Curvas de rango-abundancia de familias de parasitoides colectadas en tres estados sucecionales de la selva mediana subcaducifolia. Abundancia de las familias fue trazada sobre una escala logarítmica contra el rango de familias ordenadas por la abundancia, de mayor a menor. Los códigos de las familias más abundantes por estado sucesional: **A.** Braconidae, **B.** Diapridae, **C.** Scelionidae y **D.** Bethylidae.

Figure 4. Rank–abundance plots of families of parasitoids collected from the three vegetation succesional stages in a dry semideciduos forest. A logarithmic scale of abundance was plotted against the species-rank ordered by families, from those with the most abundant individuals to those with the fewest. The codes of families most abundant by sucecional stage: A. Braconidae, B. Diapridae, C. Scelionidae y D. Bethylidae.

La diversidad beta entre las diferentes edades fue baja, los valores de complementariedad alcanzan únicamente el 18% en las tres edades sucesionales, con 27 familias presentes en las tres edades de vegetación. Sin embargo, existieron algunas familias que se colectaron en dos edades de vegetación como fue el caso de Signiphoridae, colectada en 5 y 25 años, Tanaostigmatidae en 25 y 60 años y Trichogrammatidae 60 y 5 años. De la misma manera, se observó que algunas de las familias se colectaron sólo en una edad de vegetación, como es el caso de la familia Rhopalosomatidae que sólo se colectó en la vegetación de 5 años, y las familias Megaspilidae y Crabronidae que se colectaron únicamente en la vegetación de 25 años (Figura 5).

En cuanto a la diversidad beta, los altos números de familias compartidas puede deberse a que la mayor parte de las familias está bien representada en los tres sitios y al ser el taxón de familia un nivel taxonómico alto, no se pueden observar grandes diferencias en los ensambles; por lo que, si queremos ver diferencias en la composición de las comunidades es importante identificar los ejemplares a niveles taxonómicos más específicos como géneros y de ser posible a nivel de especie.

Las familias que fueron exclusivas para una edad de la vegetación, probablemente esté reflejando la presencia de sus hospederos, por ejemplo, Rhopalosomatidae encontrada en los fragmentos de 5 años, son ectoparasitoides de ninfas de Gryllidae (Orthoptera). Las familias Megaspilidae y Crabronidae colectadas en la vegetación de 25 años, son familias con un gran número de especies descritas y con amplios rangos hospederos, incluyendo no sólo insectos, sino también arañas (para el caso de Crabronidae), en general atacan diferentes especies de Coccinelidae, neurópteros, pupas de dípteros e hiperparasitoides de bracónidos, que fue una de las familias más abundantes. La familia Tanaostigmatidae fue la única que tuvo el mayor número de individuos en la vegetación de 60 años, sin encontrarse en la vegetación de 5 años, esto puede deberse a que varias especies de esta fami-

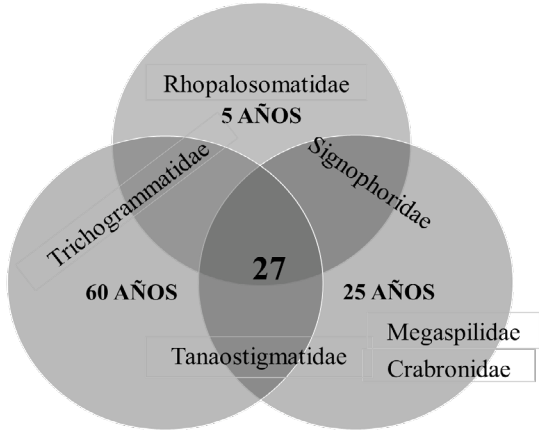


Figura 5. Diagramas de Venn que representan a las familias de parasitoides compartidas espacialmente entre las diferentes edades de la selva mediana subcaducifolia.

Figure 5. Venn diagrams representing spatial shared families of parasitoids between the three sucesional stages.

lia, no son parasitoides, sino fitófagos formadores de agallas (Goulet y Huber, 1993).

CONCLUSIONES

En conclusión, la riqueza de himenópteros parasitoides en la selva mediana subcaducifolia está integrada por 33 familias, donde la familia Braconidae fue la más abundante. La edad de la vegetación es importante no sólo en términos de abundancia, sino también de diversidad, siendo la vegetación de 5 años, donde se encontró el mayor número de ejemplares de parasitoides y en la vegetación de 25 años se encontraron comunidades más equitativas y diversas de parasitoides. Estos resultados ponen de relieve la importancia biológica de las selvas medianas subcaducifolias de Yucatán como zona de refugio y preservación de parasitoides al albergar un alto número de familias conformando comunidades diversas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al director, James Callaghan y a todo el personal de la Reserva biocultural Kaxil Kiuic; al técnico Santos, por su invaluable ayuda en las colectas. Al Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología por el financiamiento del proyecto "Diversidad de parasitoides y su relación con la complejidad estructural de la vegetación: modelos predictivos a nivel climático y de paisaje" (CB-2014-01, 241138).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores de este manuscrito hacen constar que no existe ningún conflicto de interés para la publicación de este artículo.

REFERENCIAS

Byriel, D.B., Ro-Poulsen, H., Kepfer-Rojas, S., Hansen, A.K., Hansen, R.R., Justesen, M.J., Kristensen, E., Møller C.B. y Schmidt, I.K. 2023. Contrasting responses of multiple insect taxa to common heathland management regimes and old-growth successional stages. Biodiversity and Conservation. 32(2): 545-565.

Carignan, V. y Villard, M. 2002. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. Environmental Monitoring and Assessment. 78: 45-61.

Chan-Canché, R., Ballina-Gómez, H., Leirana-Alcocer, J., Bordera, S. y González-Moreno, A. 2020. Sampling of parasitoid Hymenoptera: influence of the height on the ground. Journal of Hymenoptera Research. 78: 19-31.

Cutis, P., Castillo Sánchez, L.E., Canul Solís, J.R., López Coba, E., Ruz Febles, N.M. y Campos-Navarrete, M.J. 2022. Efectos del manejo productivo de un sistema agroforestal en la diversidad de parasitoides asociados (Hymenoptera: Braconidae) en Yucatán, México. Biotecnia. 24(2): 155-161.

Díaz-Álvarez, E.A., Manrique, C., Boege, K. y Del-Val, E. 2023. Changes in Coleopteran assemblages over a successional chronosequence in a Mexican tropical dry forest. PeerJ. 11, e15712.

Fernández, F. y Sharkey, M.J. 2006. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Fernández, F. 2022. On the diversity of Neotropical Hymenoptera. Caldasia. 44(3): 502-513.

Forbes, A.A., Bagley, R.K., Beer, M.A., Hippee, A.C. y Widmayer, H.A. 2018. Quantifying the unquantifiable: why Hymenoptera, not Coleoptera, is the most speciose animal order. BMC Ecology. 18(1): 1-11.

Flota, D.L.M., Sánchez, E.R., Moreno, A.G., Moreno, L.L., Jiménez, D.S. y Bañuelos, C.F. 2024. Insectos parasitoides asociados al agroecosistema de maíz criollo en Yucatán. Avances en investigación agropecuaria. 28(Especial): 1-14.

Fagundes, M., Santos, É.M.S., Duarte, K., Santos, L., Vieira, J., Oliveira, C. y Silva, P.S. 2020. Diversity of gall-inducing insect associated with a superhost plant species: plant architecture, resource availability and interspecific interactions. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 21(3): 1182-1189.

Gibson, G.A.P., Huber, J.T. y Woolley, J.B. 1997. Annoted keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). Research Press. Ottawa, NRC.

Godfray, H.C.J. 1994. Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

González-Maldonado, M.B., Coronado-Blanco, J.M. y Lomelí-Flores, J.R. 2020. Nuevos registros de bracónidos (Hymenoptera: Braconidae) parasitoides de gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Durango, México. Revista Colombiana de Entomología. 46(2): e8435. https://doi.org/10.25100/socolen.v46i2.8435

González-Moreno, A. y Bordera, S. 2011. New records of Ichneumonidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) from México. Zootaxa. 2879: 1-21.

González-Moreno, A. y Bordera, S. 2012. The Ichneumonidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) from Ría Lagartos Biosphere Reserve, Mexico. Zootaxa. 3230: 1-51.

González-Moreno, A., Bordera, S., Leirana-Alcocer, J. y Delfín-González, H. 2012. Diurnal flight behaviour of Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera) related to environmental factors in a tropical dryforest. Environmental Entomology. 41: 587-593.

González-Moreno, A., Bordera, S. y Delfín-González, H. 2015a. Spatio-temporal diversity of Cryptinae (Hymenoptera, Ichneumonidae) assemblages in a protected area of southeast Mexico. Journal of Insect Conservation. 19: 1153-1161.

González-Moreno, A., Bordera, S. y Sääksjärvi, I.E. 2015b. Description of three new species of *Labena* Cresson from Mexico (Hymenoptera, Ichneumonidae, Labeninae), with notes on tropical species richness. Zootaxa. 3948: 573-586.

González-Moreno, A., Bordera, S., Leirana-Alcocer J., Delfín-González, H., y Ballina-Gómez, H.S. 2018. Explaining variations in the diversity of parasitoid assemblages in a Biosphere Reserve of Mexico: evidence from vegetation, land management and seasonality. Bulletin of Entomological Research. 108(5): 602-615.

González-Moreno, A., Bordera, S., Ballina-Gómez, H. y Leirana-Alcocer, J. 2023. Age matters: variations in parasitoid diversity along a successional gradient in a dry semi-deciduous tropical forest. Bulletin of Entomological Research. 113: 604-614.

Goulet, H. y Huber, J. 1993. Hymeoptera of the world: an identification guide to families. Comunication Group. Ottawa. Canada.

Guo, P.F., Wang, M.Q., Orr, M., Li, Y., Chen, J.T., Zhou, Q.S., Staab, M., Fornoff, F., Chen, G.H., Zhang, N.L. Klein, A.M. y Zhu, C. D. 2021. Tree diversity promotes predatory wasps and parasitoids but not pollinator bees in a subtropical experimental forest. Basic and Applied Ecology. 53: 134-142.

Hernández-Stefanoni, J.L., Dupuy, J.M., Johnson, K.D., Birdsey, R., Tun-Dzul, F., Peduzzi, A., Caamal-Sosa, J.P., Sánchez-Santos, G. y López-Merlín, D. 2014. Improving species diversity and biomass estimates of tropical dry forests using airborne LiDAR. *Remote Sensing*. 4741-4763.

Jacobo-Macías, E.R., Robles-Bermúdez, A., Cambero-Campos, O.J., Coronado-Blanco, J.M., Isiordia-Aquino, N., Ruíz-Cancino, E. y Robles-Navarrete, A. P. 2022. Parasitoides himenópteros presentes en especies ambrosiales y descortezadores recolectados de *Persea americana* Mill.(Laurales: Lauraceae), en Nayarit, México. Acta zoológica mexicana. 38:1-12.

Klopfstein, S., Santos, B.F., Shaw, M.R., Alvarado, M., Bennett, A.M., Dal Pos, D., Giannotta, M., Herrera-Florez, A.F., Karlsson, D., Khalaim, A.I., Lima, A.R., Mikó, I., Sääksjärvi, I.E., Shimizu, S., Spasojevic, T., van Noort, S., Vilhelmsen, L. y Broad, G. 2019. Darwin wasps: a new name heralds renewed efforts to unravel the evolutionary history of Ichneumonidae. Entomological Communications. 1, ec01006. https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec01006.

Magurran, A.E. 2004. Measuring Biological Diversity. Blackwell Publishing. Oxford, U.K.

Polaszek, A., y Vilhemsen, L. 2023. Biodiversity of hymenopteran parasitoids. Current Opinion in Insect Science, 101026.

Quicke, D.L.J. 2015. The Braconid and Ichneumonid parasitoid wasps, Biology, systematics, evolution and ecology. Wiley Blackwell. Oxford, UK.

Ramírez-Ahuja, M., Garza-González, E. Talamas, Elijah J., Gómez-Govea, M.A., Rodríguez-Pérez, M.A., Zambrano-Robledo, P., Rebollar-Tellez, E. y Rodríguez-Sanchez, I.P. 2020. Parasitoids of Chrysopidae Eggs in Sinaloa Mexico. Insects. 11 (12): 849.

Serrano-Domínguez, A.K., Coronado-Blanco, J.M., Ruíz-Cancino, E., López-Santillán, J.A., Estrada-Drouaillet, B. y Salas-Araiza, M.D. 2021. Parasitoids of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), at Three Localities of the State of Tamaulipas, Mexico. Southwestern Entomologist. 45(4): 907-916.

Sharkey, M., Athey, K.J., Fernández-Triana, J.L., Penteado-Dias, A.M., Monckton, S.K. y Quicke, D.L. 2023. Key to the New World subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). Canadian Journal of Arthropod Identification. 49: 1-43. doi:10.3752/cjai.2023.49.

Speight, M.R., Hunter, M.D. y Watt, A.D. 2008. Ecology of Insects. Concepts and applications. Blackwell Sciencie.Oxford, UK.

Thomas, S. C. 2023. Insects and forest succession. En: Forest Entomology and Pathology. J.D. Allison, T.D. Paine, B. Slippers, M.J. Wingfield (ed.), pp. 205-236. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.

Villa-Ayala, P., Sánchez-Rivera, G., Rodríguez-Vélez, B. y Castrejón-Ayala, F. 2020. Parasitoides e hiperparasitoides asociados al pulgón amarillo del sorgo, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) 1, en el Estado de Morelos, México. Southwestern Entomologist. 45(2): 563-566.

Wan, N.F., Zheng, X.R., Fu, L. W., Kiær, L.P., Zhang, Z., Chaplin-Kramer, R., Dainese, M., Tan, J., Qiu, S.Y., Hu, Y.Q, Tian, W.D., Nie, M., Ju, R.T., Deng, J.Y., Jiang, J.X., Cai, Y.M. y Li, B. 2020. Global synthesis of effects of plant species diversity on trophic groups and interactions. Nature Plants. 6(5): 503-510.

Zhu, P., Zheng, X., Xie, G., Chen, G., Lu, Z. y Gurr, G. 2020. Relevance of the ecological traits of parasitoid wasps and nectariferous plants for conservation biological control: a hybrid meta-analysis. Pest management science. 76(5): 1881-1892.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Minimally processed yam beam roots fortified with probiotics and phenolic compound from microencapsulated green coffee

Jícama mínimamente procesada fortificada con probióticos y compuestos fenólicos de café verde microencapsulado

Miguel Abud-Archila[1] and Claudia Mendoza-Avendaño[1]*

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

ABSTRACT

Yam beam (*Pachyrhizus erosus* L.) root, commonly known as jicama, is widely consumed by health-conscious individuals due to its low caloric content, However, its nutritional value is relatively low. To enhance these nutritional properties, jicama can be supplemented with probiotics and antioxidant compounds. In this study, the jicama pieces were coated with an edible layer containing microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and phenolic compounds derived from green coffee, which were microencapsulated using a double spray drying technique. The probiotics and phenolic compounds were dried using double spray drying with chitosan at 120 and 140 °C. The results showed that the inlet air temperature did not have a statistically significant effect ($p \geq 0.05$) on the encapsulation efficiency of probiotics, chlorogenic acid and caffeine content, or antioxidant activity expressed as IC_{50} value (110 - 116 µg/mL). After 6 d of storage at 4 °C, the jicama supplemented with the microcapsules containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. exhibited a reduction in microbial viability by 1 and 2 log CFU/g, respectively. However, the addition of microcapsules allowed a higher concentration of phenolic compounds than the control group. Minimally processed jicama containing microcapsules with probiotics and phenolic compounds could be a functional food, and the reported procedure could be applied for industrial purposes.

Keywords: edible coating; antioxidant compounds; spray-dried.

RESUMEN

La raíz de ñame (*Pachyrhizus erosus* L.) comúnmente llamada jícama, es consumida por personas preocupadas por su salud ya que tiene bajo contenido calórico y, a pesar de que contiene algunas vitaminas, su contenido nutrimental es bajo. Para mejorar estas propiedades nutricionales, la jícama puede ser suplementada con probióticos y compuestos antioxidantes. En este estudio, la jícama fresca en trozos fue recubierta con microcápsulas que contenían *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. y compuestos fenólicos de café verde, los cuales fueron microencapsulados mediante secado por aspersión doble. Los probióticos y compuestos fenólicos se secaron mediante doble secado por aspersión con quitosano a 120 y 140 °C. Los resultados indicaron que la temperatura de entrada del aire no afectó estadísticamente ($p \geq 0.05$) la eficiencia de encapsulación de los microorganismos, el contenido de ácido clorogénico y cafeína, ni la actividad antioxidante expresada como IC_{50} (110 - 116 µg/mL). Después de 6 d de almacenamiento a 4 °C, en la jícama adicionada con las microcápsulas, la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. tuvieron una reducción de 1 y 2 log UFC/g, respectivamente. Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos fue superior que en la jícama del grupo control. La jícama que contiene las microcápsulas con probióticos y compuestos fenólicos podría ser un alimento funcional, y el procedimiento desarrollado podría aplicarse con fines industriales.

Palabras clave: recubrimiento comestible; compuestos antioxidantes; secado por aspersión

INTRODUCTION

In 2022, around 7100 Ha in México were planted with *Pachyrhizus erosus* L. (jicama) with an average production of 24 tons/Ha (SIAP, 2022). Jicama is a legume; the edible structural organ of this plant is the root, which is consumed fresh. The root is low in calories (40 cal) and contains vitamins, minerals and starch (Ramírez-Balboa *et al*., 2023). Although jicama contains most essential amino acids, vitamins and minerals (Duke, 1992), these nutritional values are relatively low. Therefore, jicama is a product that can be supplemented with other bioactive compounds. In this sense, antioxidant compounds and probiotics have been used to fortify other products (Granato *et al*., 2020).

Phenolic compounds exhibit significant biological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory (Albuquerque *et al*., 2021), and antitumoral (Heleno *et al*., 2015), among others. Granato *et al*. (2020) reported that an increased intake of natural phenolic compound antioxidants is associated with a reduced risk of coronary disease. While phenolic compounds are present in many fresh foods, they can also be incorporated into foods during processing. In that sense, coffee is widely recognized as a functional food with antioxidant properties, primarily due to its phenolic compounds, as noted by Jeszka-Skowron *et al*. (2016). Although coffee is mostly consumed processed, green coffee has been reported to be a rich source of phenolic compounds, such as chlorogenic acids, hydroxycinnamic acids, caffeine, and caffeic acid

*Author for correspondence: Claudia Mendoza-Avendaño
e-mail: claudia.ma@tuxtla.tecnm.mx
Received: June 10, 2024
Accepted: September 7, 2024
Published: October 8, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2350

(Macheiner *et al*., 2019), among others. However, these compounds are easily oxidized during processing and storage, which reduces their effectiveness. Due to the importance of these compounds for human health, researchers are interested in developing systems that protect bioactive compounds during co-administration (Bednarska and Janiszewska-Turak, 2020).

In the context of improving people's health, researchers are looking for new strains of probiotics, as these have been shown to provide health benefits to the host, as demonstrated by Ramírez-Pérez *et al.* (2023) in *in vivo* studies using Wistar rats. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, promote a benefit in the health of the host (Ramírez-Pérez *et al*., 2022). Probiotics can help treat gastrointestinal diseases (Fragnant *et al*., 2023), reduce serum cholesterol and heart disease (Oniszczuk *et al*., 2021), regulate glycemic indexes (Rezazadeh *et al*., 2019), control urogenital tract infections (Nader-Macías and Juárez, 2015) and stimulate the immune system (Salami *et al*., 2019). Two common probiotic microorganisms are the bacteria from the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (Ramos-Clamont *et al*., 2013; Yao *et al*., 2019). To provide these benefits, probiotic bacteria must be present with a minimum of 10^6 to 10^7 colony-forming units (CFU) per g or mL of food (FAO/WHO, 2006). However, factors such as stress produced during their management, storage and transit through gastrointestinal tract can decrease their viability (López-Fernández *et al*., 2019; Pupa *et al*., 2021).

To avoid the loss of probiotic viability and to protect phenolic compounds against adverse environmental conditions such as light, moisture, and oxygen, microencapsulation processes are often employed. Several microencapsulation processes have been developed for this purpose, which involve trapping the bioactive compound within a coating material (Reque and Brandelli, 2021). Spray drying is the most widely used technique for protecting probiotics (Russo *et al*., 2022) and phenolic compounds. Because it is difficult for a single encapsulant matrix to have all the required characteristics, it is common to use carbohydrates, proteins and polysaccharides at different ratios (Navarro-Flores *et al*., 2020) or multilayers of these (Abrahão *et al*., 2019; Pupa *et al*., 2021). Chitosan is one of the most promising coating materials used for microencapsulation to improve the stability of phenolic compounds and probiotics (Pupa *et al*., 2021). Microcapsules obtained by spray drying with chitosan are very stable in storage and demonstrate controlled release characteristics because of their low solubility at neutral pH (Flores-Belmont *et al*., 2015).

Although the separate microencapsulation of phenolic compounds and probiotic has been reported in several studies, few have evaluated the effect of double microencapsulation by spray drying on cell viability, phenolic compounds content and the properties of the microcapsules. Additionally, only a limited number of papers have explored the used of these microcapsules in the development of functional foods. Given that jicama has limited attractive nutritional characteristics but is consumed for its low caloric content, this research aimed to determine the effect of inlet air temperature on the properties of microcapsules obtained by single and double spray drying. Moreover, the effect of the addition of probiotics and phenolic compounds from green coffee microencapsulated in coating form on the microbiological, physicochemical, and sensory properties of minimally processed jicama roots was tested.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and conditions of cultivation

Lactobacillus acidophilus and *Bifidobacterium* spp. (Vivolac, Mexico) were reactivated in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth supplemented with 0.05 % (w/v) cysteine, and incubated at 38 °C for 20 h. Subsequently, cells were centrifuged at 4500 rpm for 15 min, at 4 °C. The pellet containing the cells was washed twice with 0.9 % (w/v) saline solution and centrifuged using the same conditions (Odila *et al*., 2016).

Preparation of green coffee extract

The green coffee beans were ground and then passed in a sieve 40 (0.420 mm) to produce green coffee powder. To obtain the green coffee extract, the methodology of Budryn *et al*. (2013) was employed with some modifications. Briefly, the green coffee powder was mixed with distilled water at a 1:5 (w/v) ratio and heated at 90 °C for 1 h. Subsequently, the solution was filtered using filter paper (0.16 mm pore size). Finally, the green coffee extract (GCE) was stored in amber jars at 4 °C until use.

Encapsulation of probiotics and phenolic compounds

The double microencapsulation of microorganisms and coffee extract was performed following the methodology proposed by Flores-Belmont *et al*. (2015), with some modifications. In the first step, an aqueous of gelatin-maltodextrin (1:25) solution, at 26 % (w/w), was prepared in an ascorbic acid solution at 1 % (w/v). The GCE was added to a final concentration of 4.2 mg gallic acid equivalent/mL. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. were added to a final concentration of 10^9 and 10^8 CFU/mL, respectively. Subsequently, the mixture was homogenized using an Ultra Turrax T-25 Basic Homogenizer at 4500 rpm for 5 min. The mixture was fed into a spray dryer (BUCHI Mini B-290, Flawil, Switzerland) at a constant flow of 14 mL/min, and two inlet air temperatures, 120 °C and 140 °C, were evaluated, with an outlet air temperature of 50 °C. The microcapsules obtained in the first spray-dried process were hydrated and dried by spray drying in a second step. For this, 10 g of the microcapsules were added to 100 mL of a 0.5 % (w/v) chitosan solution prepared in 1 % (v/v) acetic acid, and the mixture was subjected to the drying process following the same conditions as the first step. Finally, the microcapsules were stored in vacuum-sealed metal bags until use.

Efficiency of probiotic microencapsulation

The microencapsulation efficiency of probiotic microorganisms (MEP) was evaluated using one gram of the suspension before drying or one gram of the microcapsules which were

mixed with 9 mL of sterile peptone water (0.1 %, w/v). Viable cell counts were determined in triplicate by plate seeding using MRS agar supplemented with L-cysteine (0.05 % w/v) and incubated at 37 °C (72 h). Previous results showed that the morphology of colonies was different for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. The results were expressed as a log CFU/g sample as suggested by Pupa *et al*. (2021). The MEP was calculated by equation1:

$$\text{MEP}\ (\%) = (\text{N}/\text{No}) \times\ 100 \quad (1)$$

where No and N represented the log of the number of viable cells (CFU) before and after the encapsulation process, respectively.

Powder properties

After simple and double spray drying, microcapsules were characterized in terms of water solubility index (WSI), water absorption rate (WAR), swelling capacity (SC), morphology, microencapsulation efficiency of phenolic compounds (MYp) and antioxidant activity (AA).

Water solubility index (WSI), water absorption rate (WAR) and swelling capacity (SC)

The WSI was determined according to Paini *et al*. (2015). One gram of the microcapsules was mixed with 12 mL of distilled water, mixed and incubated at 30 °C for 30 min. The sample was then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a capsule and dried at 105 °C until it reached a constant weight. The WSI, WAR, and SC were calculated using equations 2, 3, and 4, respectively:

$$\text{WSI}\ (\%) = \frac{\text{Supernatant dried weight}}{\text{Initial weight microcapsules}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{WAR}\ (\text{g/g}) = \frac{\text{Fresh sediment weight}}{\text{Initial weight microcapsules}} \quad (3)$$

$$\text{SC}\ (\text{g/g}) = \frac{\text{Supernatant dried weight}}{\text{Initial weight microcapsules}\ (100 - \text{WSI})} \quad (4)$$

Microcapsule morphology

The morphology of the microcapsules was examined by scanning electron microscopy (SEM) using a high-resolution, high-vacuum microscope (SM-71480 JEOL, Massachusetts, USA). The microcapsules were attached to the sample holder with double-sided adhesive tape. SEM images were taken at room temperature and examined using an acceleration voltage of 15 kV according Navarro-Flores *et al*. (2020).

Microencapsulation efficiency of phenolic compounds (MYp)

The microencapsulation efficiency of phenolic compounds (MYp) was calculated by using the total and superficial phenolic compounds in microcapsules, following the methodology described by Navarro-Flores *et al*. (2020). Briefly, to measure the total phenol content, 200 mg of the microcapsules were mixed with 2 mL of methanol:acetic acid:water solution (50:8:42 v/v/v). The mixture was shaken for 1 min, sonicated twice in a Cole-Palmer ultrasonic bath model 08855-00 (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA) at 25 °C for 20 min, and finally centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The supernatant was used for quantifying the total phenolic content. For determination of superficial phenolic compounds content, 200 mg of the microcapsules were mixed with 2 mL of ethanol:methanol solution (1:1), agitated for 1 min, and then centrifuged at 4,000 rpm for 5 min, and the content of phenolic compounds was determined according to Navarro-Flores *et al*. (2020). The content of the total and superficial phenolic compounds was determined with Folin-Ciocalteu reagent, with the method described by Singleton *et al*. (1999) using gallic acid as the standard. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of powder. The efficiency of the microencapsulation of phenolic compounds was determined by Eq. 5:

$$\text{MYp}\ (\%) = \frac{\text{PCtotal} - \text{PCsup}}{\text{PCtotal}} \times 100 \quad (5)$$

where PCtotal is the total phenolic compound (mg GAE/g) and PCsup is the superficial phenolic compound (mg GAE/g).

Antioxidant activity (AA)

The AA was determined by measuring the inhibitory effect against the DPPH radical, following the method described by Shekhar and Anju (2014), with some modifications. Briefly, several microcapsules´s solutions (25, 50, 100, 150, and 200 µg/mL) were prepared. Three milliliters of each solution were mixed with 1 mL of DPPH (0.1 mM). After 30 min of incubation, the absorbance of the solution was measured at 517 nm. The AA was calculated using equation 6:

$$\text{AA}\ (\%) = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \quad (6)$$

where Abs control is the absorbance of the control and Abs sample is the absorbance of the sample.

The EC_{50} value of the sample, which represents concentration required to inhibit 50 % of the DPPH radical, was calculated using the inhibition curve.

Finally, microcapsules with the best properties, such as low solubility index, higher antioxidant activity, and greater encapsulation efficiency of phenolic compounds and probiotics, were selected for the next stage of this research. Once selected, the effect of applying these microcapsules to fresh pieces of jicama was studied.

Coating of minimally processed jicama roots

To determine the effect of the addition of the edible coating on the physicochemical and microbiological properties of the minimally processed jicama roots, five types of coatings were evaluated: (1) gelatin-maltodextrin (1:25) 26 % (w/w) aqueous solution (referred as "C"); (2) GCE at a final concentration of 4.2 mg GAE/mL and *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. at a final concentration of 10^9 and 10^8 CFU/mL, respectively, added to a gelatin-maltodextrin (1:25) at 26

% (w/w) aqueous solution (referred as "EP"); (3) GCE at a final concentration of 4.2 mg GAE/mL added to gelatin-maltodextrin (1:25) 26 % (w/w) aqueous solution (referred as "E"); (4) *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. at a final concentration of 10^9 and 10^8 CFU/mL, respectively, added to gelatin-maltodextrin (1:25) 26 % (w/w) aqueous solution (referred as "P"), and (5) microcapsules obtained after double spray drying process (referred as "MC").

The jicama roots were washed, disinfected, and cut into cubes (2 x 2 x 1 cm, 5±0.5 g) using a sterile knife. For coatings C, EP, E, and P, the jicama roots were immersed in the respective mixtures for one minute. For treatment MC, the jicama was coated with a thin layer of powder (approximately 0.3 grams of microcapsules per piece). Previous results indicated that this method produced a uniform layer of the microcapsules on the surface of each jicama piece. The samples coated were stored in polypropylene containers (4 x 6 x 6 cm) at 4 °C for six days. Microbiological and physicochemical properties (weight loss, pH, color, total phenolic compounds, caffeine and chlorogenic acid) of the samples were analyzed at 0, 1, 3, and 6 days.

Determination of shelf-life characteristics of jicama roots

To measure the weight loss, the jicama was weighed on the sampling days. The total weight loss was calculated by equation 7:

$$\text{Total weight loss (\%)} = \frac{\text{Weight (t)}}{\text{Weight on day 0}} \times 100 \quad (7)$$

The surface color of the jicama was determined using a portable colorimeter (ColorTec, Clinton, NJ, USA). The values of L* (luminosity), a* (-green a + red), and b* (-blue a + yellow) were recorded, and the chromaticity (C*) was then calculated using equation 8:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (8)$$

To measure the pH, the samples were blended, and the juices were centrifuged at 4500 rpm for 3 min at 4 °C before measuring pH using a pH meter (Hanna Instruments HI981031, Woonsocket, RI, USA).

Quantification of total phenolic compounds (TPC), caffeine (CF) and chlorogenic acid (CL) in the jicama roots

The extracts used for TPC, CF and CL determinations were obtained according to the methodology described by Desai *et al*. (2019). For that, jicama samples were freeze-dried using a lyophilizer (Labconco FreeZone 4.5 L, Kansas City, USA) at -40 °C and 0.250 mbar for 48 h. Then, 0.5 g of the lyophilized sample was mixed with 2.5 mL of a methanol:acetic acid:water solution (50:8:42 v/v/v). The mixture was shaken for 1 min, sonicated twice in a Cole-Palmer ultrasonic bath model 08855-00 (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA) at 25 °C for 20 min, and finally centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The supernatant was used for quantifying the phenolic compound content according to Joya-Dávila *et al*. (2023).

Caffeine and chlorogenic acid were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Kromasil 100-5-C18 column (4.6 x 150 mm, 5 µm, 100 A-Supelco, Bellefonte, CA, USA), using a diode array detector (PerkinElmer Series 200 HPLC Systems, Shelton, CT, USA). The samples were filtered with a 0.22 µm millipore membrane. The mobile phase was acetonitrile/formic acid at 0.1 % (80:20, v:v) (Phase A) and formic acid at 1 % (v/v) (Phase B) at a 10:90 ratio with a constant flow of 1 mL per min in isocratic mode. Quantification was performed at 280 nm for CF and 320 nm for CL, and 10 µL of the sample were injected into the HPLC. In addition, standard solutions of the analytes to be quantified (50, 100, 200, 300, 400, 500, and 700 mg/L) were prepared for elution times and respective calibration curves. Metabolites were expressed in milligram GAE per gram of jicama root in dry basis.

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design with three replicates was employed for two evaluations. The results were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) to determine significant differences between treatments ($p \leq 0.05$). Honestly-significant-difference (HSD) or Tukey test were used for mean comparisons. Statistical analyses were carried out using Statgraphics Centurion XVI software.

RESULTS AND DISCUSSION

Survival of probiotics during the spray drying process

The results indicated that the encapsulation efficiency of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. was not significantly affected by the inlet air temperature, regardless of whether single or double spray drying was used. After the single drying, cell viability ranged from 9.39 to 9.12 log CFU/g for *Lactobacillus acidophilus* and 7.91 to 7.85 log CFU/g for *Bifidobacterium* spp. The encapsulation efficiency of both microorganisms at 120 or 140 °C after the single drying was around 90 % (Table 1). However, the encapsulation efficiency for both microorganisms after the double drying process was around 73- 77 %. Despite this reduction, cell viability remained at 7.2 log CFU/g for *Lactobacillus acidophilus* and 6.2 log CFU/g for *Bifidobacterium* spp. Despite the decrease in cell viability, the use of chitosan as a coating material allowed obtaining powders with a probiotic content higher than 10^6 CFU/g of microcapsules. Similar results were reported by Pupa *et al*. (2021) and Flores-Belmont *et al*. (2015), who encapsulated different species of lactic acid bacteria with chitosan through a double spray drying process, with encapsulation efficiencies of approximately 70 %.

Microcapsules properties

Micrographs, water solubility index (WSI), water absorption rate (WAR) and swelling capacity (SC) of microcapsules after single and double spray drying

Micrographs show that the microcapsules had a spherical

Table 1. Inlet air temperature effect on microencapsulation efficiencies of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. after the spray drying process.
Tabla 1. Efecto de la temperatura del aire de entrada sobre la eficiencia de microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. después del proceso de secado por aspersión.

Spray drying	Inlet air temperature (°C)	*Lactobacillus acidophilus* (%)	*Bifidobacterium* spp. (%)
Single	120	92.13±1.28 a*	92.55±1.34 a
	140	92.28±1.49 a	91.31±2.83 a
Double	120	76.24±0.54 b	77.18±0.11 b
	140	73.30±1.07 b	73.48±2.23 b
HSD		4.68	7.81

* Means followed by different lowercase letters in a column are significantly different according to the Tukey HSD test ($p \leq 0.05$).
Medias seguidas con diferentes letras minúsculas en una columna son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

shape with dents and free of cracks on the surface, and an approximate average diameter of 15 µm (Figure 1). For microcapsules obtained by single and double spray drying at 120 and 140 °C, the size did not differ. The solubility of the microcapsules obtained by single spray drying ranged from 88 to 89 % (Table 2). These results are similar to those reported by Navarro-Flores *et al*. (2020), who encapsulated phenolic compounds using maltodextrin and other unconventional agents. These high solubility index could be attributed to the high solubility of the encapsulant agents (Fazaeli *et al*., 2012). Additionally, gelatin and maltodextrin contain hydrophilic sections, so they could interact and create a more soluble particle in aqueous environments (Semenova *et al*., 2002). Moreover, the water solubility index decreased for the microcapsules obtained by double microencapsulation through spray drying with chitosan (Table 2), compared with microcapsules obtained by single spray drying. This reduction can be attributed to the low solubility of chitosan at pH values above 6.5 (Aranaz *et al*., 2021). These results are similar to those reported by Flores-Belmont *et al*. (2015), who indicated that double microencapsulation with chitosan resulted in less insoluble powders in water (pH 7).

Water absorption rate values of microcapsules ranged from 0.11 to 0.34 g/g (Table 2). These values are similar to those reported by other authors (Da Costa *et al*., 2018; Navarro-Flores *et al*., 2020). It has been reported that variations in WAR may be due to the different degrees of participation of hydroxyl groups present in encapsulant agents in the formation of hydrogen bonds with water (Ahmed *et al*., 2010; Da Costa *et al*., 2018). The WAR of microcapsules obtained by single spray drying were lower than those by double spray drying with chitosan. This reduction can be attributed to the low solubility of chitosan at pH values above 6.5 as mentioned previously. At basic pH, the amino groups of chitosan are in their deprotonated form ($-NH_2$), which reduces their ability to interact with water and decreases the polymer´s solubility (Aranaz *et al*., 2021). SC values ranged from 0.037 to 0.092 g/g (Table 2). The SC values decreased significantly ($p \leq 0.05$) for the microcapsules obtained by double spray drying

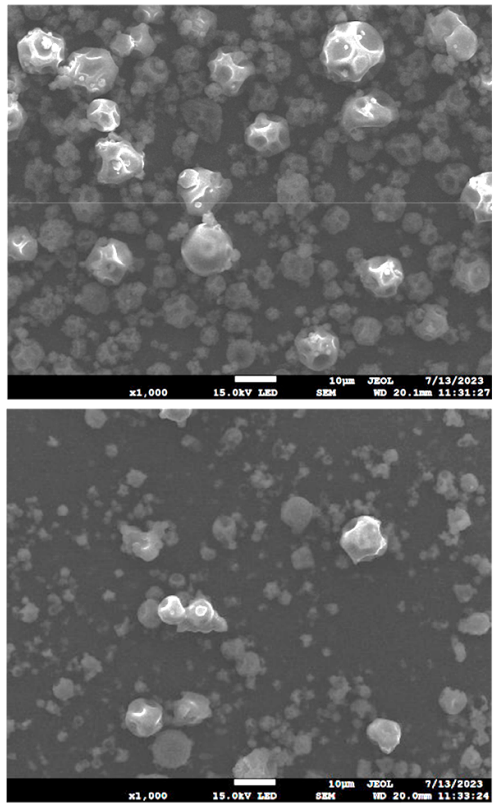


Figure 1. SEM micrographs of spray-dried powder particle; simple spray-dried process (a) and the double spray-dried process (b).
Figura 1. Micrografías SEM de partículas de polvo secado por aspersión; secado por aspersión simple (a) y secado por aspersión doble (b).

compared with microcapsules obtained by single spray drying, probably due to the presence of chitosan. Ahmed *et al*. (2010) reported that a low swelling capacity is related to the greater stability of microcapsules, which reduces their ability to swell.

Encapsulation efficiency of phenolic compounds and antioxidant activity of microcapsules after single and double spray drying

The inlet air temperature and the double encapsulation process with chitosan did not have a statistically significant effect ($p \geq 0.05$) on the encapsulation efficiency of phenolic compounds, with percentages ranges of 91.60 - 93.16 % (Table 3). The total phenol content in microcapsules ranged from 8.06 to 11.89 mg GAE/g of powder (Table 3). These values are similar to those reported by Desai *et al*. (2019) for green coffee extract encapsulated with maltodextrin, with a TPC of 11.98 mg GAE/g of powder.

The results indicated that increasing the inlet air temperature to 140 °C or the double spray drying process, the total phenol concentration of the microcapsules decreased significantly ($p \leq 0.05$). Despite the decrease in phenolic compounds, the antioxidant activity, measured as IC_{50}, remained unchanged. During spray drying, some phenolic compounds may degrade; however, new derivative compounds that are highly effective at inhibiting free radicals can be formed, as noted by Abrahão *et al*. (2019). Additionally, during thermal

Table 2. Water solubility index, water absorption, swelling capacity, phenolic compounds, chlorogenic acid content, caffeine content, IC_{50}, and the microencapsulation efficiency of phenolic compounds of microcapsules by simple and double spray drying.
Tabla 2. Índice de solubilidad en agua, absorción de agua, capacidad de hinchamiento, compuestos fenólicos, contenido de ácido clorogénico, contenido de cafeína, IC_{50} y eficiencia de microencapsulación de compuestos fenólicos de microcápsulas mediante secado por aspersión simple o doble.

Treatment	Water solubility index (%)	Water absorption rate (g/g)	Swelling capacity (g/g)	Phenolic compound (mg EAG/g)	Chlorogenic acid (mg/g)	Caffeine (mg/g)	Microencapsulation efficiency of phenolic compound (%)	IC_{50} (µg/mL)
Single 120 °C	88.53±1.47 ^{a*}	0.11±0.04 ^{b}	0.078±0.011 ^{a}	11.89±0.01 ^{a}	4.57±0.02 ^{a}	2.74±0.38 ^{a}	92.14±0.11 ^{a}	110.21±2.61 ^{a}
Single 140 °C	89.93±1.95 ^{a}	0.12±0.02 ^{b}	0.092±0.022 ^{a}	8.93±0.66 ^{b}	4.43±0.22 ^{a}	2.70±0.04 ^{a}	93.16±0.60 ^{a}	114.43±1.65 ^{a}
Double 120 °C	78.90±0.76 ^{b}	0.34±0.05 ^{a}	0.037±0.002 ^{b}	9.62±0.12 ^{b}	4.21±0.31 ^{a}	2.47±0.05 ^{a}	91.60±0.40 ^{a}	111.42±3.37 ^{a}
Double 140 °C	78.39±0.15 ^{b}	0.30±0.08 ^{a}	0.037±0.002 ^{b}	8.06±0.44 ^{b}	4.28±0.01 ^{a}	2.22±0.12 ^{a}	92.19±0.23 ^{a}	116.28±0.97 ^{a}
HSD	3.34	0.14	0.03	1.64	0.77	0.83	1.56	9.51

*Means followed by different lowercase letters in the same column are significantly different according to the Tukey HSD test ($p \leq 0.05$).
Medias seguidas con diferentes letras minúsculas en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Table 3. Total phenolic compounds content in jicama roots during storage at 4 °C for six days.
Tabla 3. Contenido total de compuestos fenólicos en jícama durante el almacenamiento a 4 °C durante seis días.

Phenolic compounds (mg GAE/g of jicama roots in dry base)					
Treatment	Time (days)				HSD
	0	1	3	6	
C	0.99±0.01 ^{cA*}	0.99±0.01 ^{cA}	0.96±0.01 ^{cA}	0.99d±0.02 ^{cA}	0.06
EP	1.50±0.02 ^{bA}	1.50±0.04 ^{bA}	1.50±0.01 ^{bA}	1.49.44±0.01 ^{bA}	0.10
E	1.50±02 ^{bA}	1.50±0.03 ^{bA}	1.50±0.03 ^{bA}	1.49±0.01 ^{bA}	0.07
P	0.97±0.01 ^{cA}	0.98±0.01 ^{cA}	0.98±0.1 ^{cA}	0.98±0.01 ^{cA}	0.03
MC	4.31±0.12 ^{aA}	3.93±0.02 ^{aAB}	3.38±0.21 ^{aBC}	3.00±0.12 ^{aC}	0.57
HSD	0.22	0.09	0.40	0.22	

C (Control), EP (green coffee extract/probiotics), E (green coffee extract), P (probiotics), MC (microcapsules with chitosan obtained by double spray drying). *Means followed by different lowercase letters in the same column are significantly different according to the Tukey HSD test ($p \leq 0.05$). Means followed by different uppercase letters in the same row are significantly different according to the Tukey HSD test ($p \leq 0.05$).
C (Control), EP (extracto de café verde/probiótico), E (extracto de café verde), P (probióticos), M (microcápsulas con quitosano obtenidas mediante doble secado por aspersión). * Medias seguidas con diferentes letras minúsculas en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Medias seguidas con diferentes letras mayúsculas en la misma linea son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

process, the Maillard reaction can occur, producing complexes with varying degrees of antioxidant activity (Liang *et al*., 2016).

The results also showed that around 110 - 116 µg/mL of microcapsules was needed to inhibit 50 % of DPPH radical (IC_{50}), and the double encapsulation process did not significantly affect this IC_{50} value. In addition, neither the inlet air temperature and double encapsulation caused significant differences in the concentrations of chlorogenic acid and caffeine. This suggests that the double encapsulation process using chitosan effectively preserves both phenolic compounds and their antioxidant activity.

Based on these results, only the microcapsules obtained by double spray drying with chitosan at an inlet air temperature of 120 °C were used for the subsequent jicama coating experiments.

Coating of minimally processed jicama roots

Determination of shelf-life characteristics

Weight loss results (Figure 2a) showed that jicama coated with microcapsules obtained by double encapsulation with chitosan (MC) showed the highest weight loss at the end of a 6 days of storage. Moreover, EP, E, and P treatments provided a significant additional protection ($p \geq 0.05$) against weight loss compared to treatment MC. Wong *et al.* (2021) reported that weight loss in food during storage is mainly due to water migration from plant tissues to the outdoor environment through transpiration. In addition, the moisture difference between the jicama and the environment was probably the driving force for weight loss.

The pH of the jicama decreased significantly during storage ($p \leq 0.05$), with the lowest pH values observed in treatments containing probiotic microorganisms (MC, EP and P) compared to the treatments without probiotics

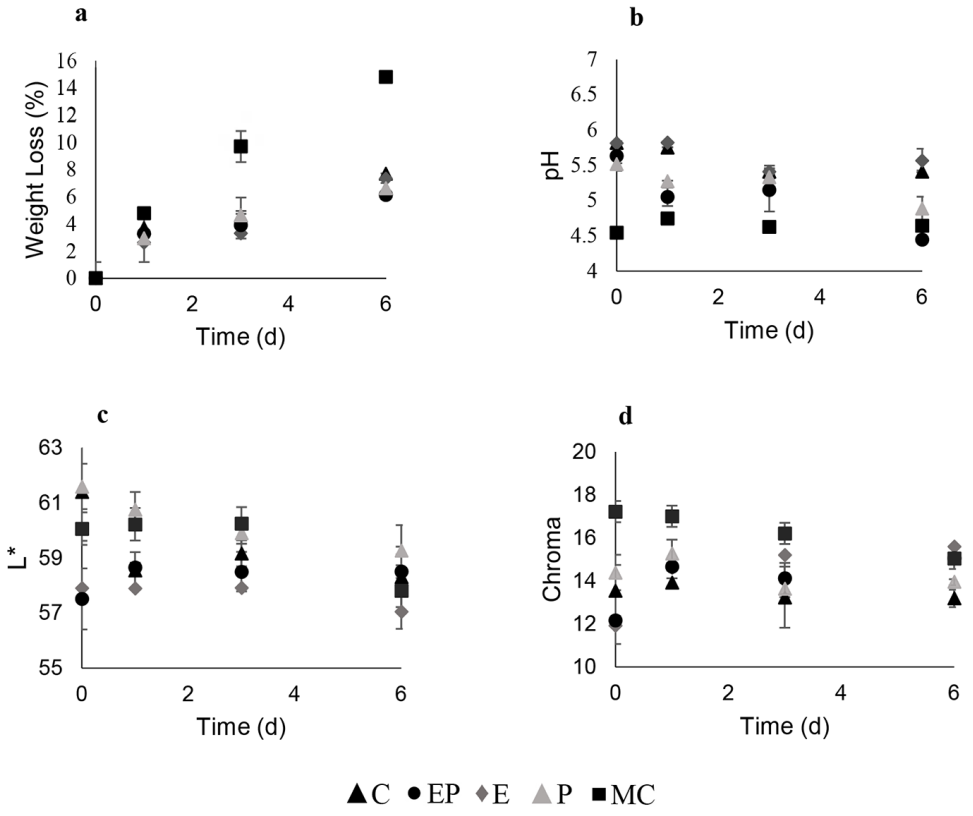


Figure 2. Effect of different types of coatings on weight loss (**a**), pH (**b**), luminosity (**c**) and chromaticity (**d**) of jicama during storage at 4 °C for six days. C (Control); EP (green coffee extract/probiotics); E (green coffee extract); P (probiotics); MC (microcapsules with chitosan obtained by double spray drying).
Figura 2. Efecto de diferentes tipos de recubrimientos sobre la pérdida de peso (**a**), pH (**b**), luminosidad (**c**) y cromaticidad (**d**) de jícama mínimamente procesada durante el almacenamiento a 4 °C durante seis días. C (Control); EP (extracto de café verde/probióticos); E (extracto de café verde); P (probióticos); MC (microcápsulas con quitosano obtenidas por secado por aspersión doble).

(Figure 2a). This could be attributed to the fact that during storage of jicama, even under refrigeration, probiotics could use the nutrients present in the coating and/or jicama pieces, producing organic acids, such as lactic acid, which could cause a decrease in pH. Wong *et al.* (2021) reported similar pH decreases in fresh-cut apple slices coated with *Lactobacillus plantarum*. The decrease in pH during the storage of minimally processed foods can be attributed to the activity of endogenous enzymes, which can produce acids and contribute to pH reduction. In treatments containing probiotics, the pH decrease can be attributed to the microbiological activity of the added microorganisms (Varoquaux and Wiley, 2017). Among the treatments with probiotics, the most pronounce pH reduction in jicama was observed in those with free microorganisms (treatments EP and P) (Figure 2a). This pH reduction could suggest a likely decrease in product acceptance. Otherwise, the pH of the jicama coated with the microcapsules (treatment MC) remained almost constant during storage. This could be attributed to the fact that spray drying decreased the cell metabolic activity of the bacterial cells (Behboudi-Jobbehdar *et al*., 2013).

Color is another important attribute of minimally processed foods, as affects the appearance and consumer's acceptance of the product. On the cutting surface, cell rupture can occur, allowing substrates and oxidizers to come into contact. Therefore, one of the main objectives during the minimum processing of fruit and vegetables is to preserve the original color. Changes in the color of the samples were expressed through chromaticity (value C*) and luminosity (L*) with respect to time (Figure 2 c). In general, the results indicated that at the beginning of storage, the samples that had the coating with the unencapsulated green coffee extract (E and EP) were significantly opaquer than the control, whereas samples coated with powder obtained from double spray drying showed L* values similar to the control treatment. This behavior could be attributed to the color masking effect of the encapsulant agents on the color of the green coffee extract (Piedrahíta *et al*., 2018). After 6 days of storage, however, there was no significant statistical difference ($p \geq 0.05$) in the luminosity of the samples. Color changes in the samples were expressed through chromaticity (C* value) over time; after 6 days of storage, there were no significant changes in the color of the samples.

Viability of probiotic microorganisms in jicama

The viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in different types of coatings for minimally processed of jicama´s pieces during storage at 4 °C are shown in Figures

3a and 3b, respectively. As can be seen, the number of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. cells remained constant during the 6 days of storage in EP and P treatments. This could have occurred because microorganisms remain metabolically active, probably by using impregnated carbohydrates and/or nutrients from the jicama as a carbon source (Wong *et al*., 2021). For the MC treatment (jicama coated with microcapsules) after 3 days of storage, the viability of microorganisms decreased significantly ($p \leq 0.05$) (Figures 3a and 3b), probably because double spray drying with chitosan caused damage to the cell membrane of the probiotics. Therefore, when the microcapsules were applied to the jicama, they were hydrated, and the probiotics were reactivated. However, the microorganisms, having been damaged in the double drying, began their death phase.

Total phenol, caffeine, and chlorogenic acid content during the storage of minimally processed jicama roots

The results of the total phenol content (mg/g of jicama roots in dry basis) during storage are presented in Table 3. The control treatment had a total phenol concentration of 0.99 mg GAE/g. Treatments E, EP, and MC exhibit higher total phenol content than the control (C). These results could be attributed to the green coffee extract present in these treatments, which were reported as an excellent source of phenolic compounds (Desai *et al*., 2019). The main phenolic compounds present in the green coffee extract are caffeine and chlorogenic acid, so these metabolites were quantified (Supplementary Fig. S1). Treatments C and P did not show detectable levels of caffeine or chlorogenic acid. In contrast, treatments E and EP resulted in caffeine and chlorogenic acid content to remain in the range of 0.43 - 0.38 mg/g and 0.42- 0.41 mg/g, respectively, throughout storage.

In the MC treatment, the content of caffeine (0.72 - 0.48 mg/g) and chlorogenic acid (1.11- 0.55 mg/g) were significantly higher ($p \leq 0.05$) during the entire storage compared with the other treatments. During storage, the concentration of total phenols, caffeine, and chlorogenic acid decreased

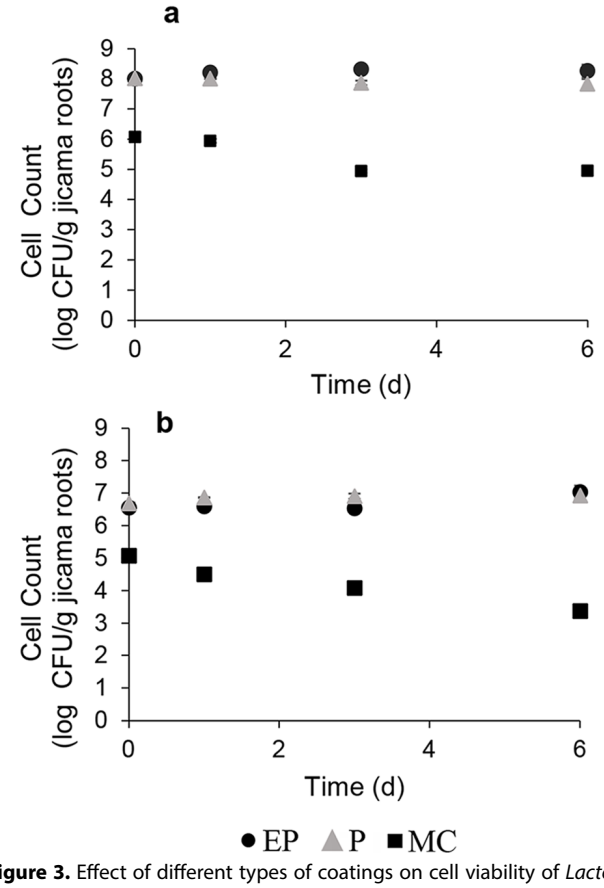


Figure 3. Effect of different types of coatings on cell viability of *Lactobacillus acidophilus* (**a**) and *Bifidobacterium* spp. (**b**) during the storage of jicama roots at 4 °C for six days. EP (green coffee extract/probiotics); P (probiotics); MC (microencapsulated with chitosan obtained by double spray drying). The other treatments are omitted because they were not inoculated.

Figura 3. Efecto de diferentes tipos de recubrimientos sobre la viabilidad celular de *Lactobacillus acidophilus* (a) y *Bifidobacterium* spp. (b) durante el almacenamiento de jícama a 4 °C durante seis días. EP (extracto de café verde/probióticos); P (probióticos); MC (microencapsulado con quitosano obtenido por secado por doble pulverización). Los demás tratamientos se omiten por no ser inoculados.

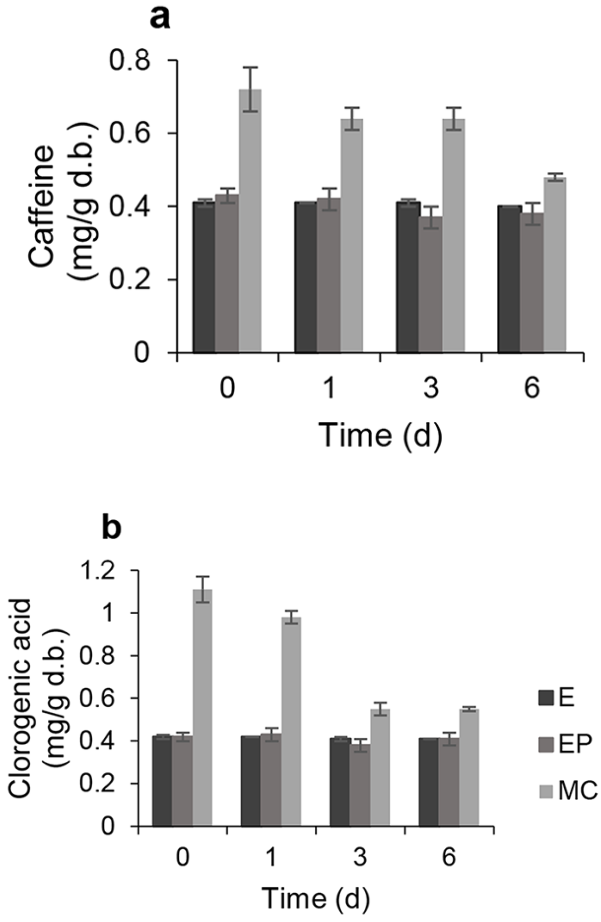


Figure S1. Effect of different types of coating on the caffeine (a) and chlorogenic acid (b) content in jicama roots during storage at 4 °C for six days. E: green coffee extract; EP: green coffee extract/probiotics; MC: Microencapsulated with chitosan obtained by double spray drying.

Figura S1. Efecto de diferentes tipos de recubrimiento sobre el contenido de cafeína (a) y ácido clorogénico (b) de raíces de jícama durante el almacenamiento a 4 °C durante seis días. E: extracto de café verde; EP: extracto de café verde/probióticos; MC: Microencapsulado con quitosano obtenido mediante secado por aspersión doble.

significantly ($p \leq 0.05$) in the samples of the MC treatment (jicama coated with the microcapsules obtained by double spray drying), compared with the other treatments. It has been reported that incorporating probiotics into vegetables matrices using the immersion technique allows microorganisms to enter the interior of the food through capillarity, promoting their adherence and protecting them from external conditions (De Oliveira *et al*., 2017). Additionally, refrigeration helps maintain the stability of probiotics, as reported by Wong *et al*. (2021). However, the MC treatment presents a higher content of these phenolic compounds (caffeine and chlorogenic acid) throughout the complete jicama storage. The reduction of these compounds concentration could be originated for the microcapsule's hydration and their partial hydration during the storage of the food, which causes the release of phenolic compounds into the outside environment. França *et al*. (2018) reported that in chitosan microcapsules the active compound is trapped in the nucleus and covered by a chitosan layer, which, depending on storage conditions, can swell and then release the nutrient.

CONCLUSIONS

In this study, microcapsules containing probiotics and phenolic compounds were obtained through single and double spray drying at 120 and 140 °C. Double spray drying with chitosan allowed microcapsules with a microbial population higher than 10^6 CFU/g and 9.62 mg GAE/g of phenolic compounds. Moreover, these microcapsules were used as an edible coating containing probiotics and phenolic compounds from green coffee, applied to minimally processed jicama root. Jicama pieces with encapsulated probiotics and phenolic compounds can be considered functional food due to their enhanced nutritional quality. To the best of the authors' knowledge, this is the first investigation incorporating a chitosan coating, obtained through a double spray drying process, into a minimally processed food. The microcapsules developed with the encapsulated probiotics and phenolic compounds allowed preserved the viability of probiotics and the concentration of phenolic compounds, such as caffeine and chlorogenic acid, in jicama during storage. This study reports the formulation and production of a functional food with high nutritional value and that can be used as a healthy snack. However, further research is recommended to extend the shelf life of coated jicama to enhance its appeal to industrial manufacturers.

ACKNOWLEDGMENTS

Mendoza-Avendaño thanks the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT, Mexico) for the postdoctoral scholarship (2731630). The authors thank Edith Ponce-Recinos (Universidad Politécnica de Chiapas, México) for support with the SEM technique.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

Abrahão, F.R., Rocha, L.C.R, Santos, T.A., Carmo, E.L., Pereira, L.A.S., Borges, S.V., Alvarenga, R.G.F.P. and Botrel, D.A. 2018. Microencapsulation of bioactive compounds from espresso spent coffee by spray drying. LWT-Food Science and Technology. 103: 116-124. Doi: 10.10.1016/j.lwt.2018.12.061

Albuquerque, B., Heleno, S.A., Oliveira, B.P.P., Barros, L. and Ferreira, C.F.R. 2021. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. Food & Function. 12: 14-29. Doi:10.1039/d0fo02324h

Ahmed, M., Akter, M.S., Lee, J.C. and Eun, J.B. 2010. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. LWT-Food Science and Technology. 43(9): 1307-1312. Doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.014

Aranaz, I., Alacántara, A.R., Civera, M.C., Arias, C. Elorza, B., Caballero, A.H. and Acosta, N. 2021. Chitosan: An overview of its properties and applications. Polymers. 13(19): 1-27. Doi: 3390/polym13193256

Bednarska, M.A. and Janiszewska-Turak, E. 2020. The influence of spray drying parameters and carrier material on the physico-chemical properties and quality of chokeberry juice powder. Journal of Food Science and Technology. 57(2): 564-577. Doi: 10.1007/s13197-019-04088-8

Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L. and Fisk, I. 2013. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748. Drying Technology. 31(11): 1274-1283. Doi: 10. 1080/07373937.2013.788509

Budryn, G., Żyżelewicz, D., Nebesny, E., Oracz, J. and Krysiak, W. 2013. Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. Food Research International. 50(1): 149-160. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.006

Da Costa, R.S., Texteira, B.C., Gabbay, A.T.V., Ribeiro-Costa, R.M., Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Converti, A., Silva, J.J.O.C. and Perego, P. 2018. Optimization of spray drying conditions to microencapsulate cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) seed by-product extract. Natural Product Research. 33(18): 1-9. Doi: 10.1080/14786419.2018.1462178

De Oliveira, P.M., Ramos, A.M., Martins, E.M.F., Vieira, É.N.R., Soares, A.S. and de Noronha, M.C. 2017. Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. International Journal of Food Science & Technology. 52(12): 2547-2554. Doi: 10.1111/ijfs.13540

Desai, M.N., Haware, D.J., Basavaraj, K. and Murthy, P.S. 2019. Microencapsulation of antioxidant phenolic compounds from green coffee. Preparative Biochemistry Biotechnology. 49(4): 400-406. Doi: 10.1080/10826068.2019.1575858

Duke, J.A. 1992. Dr. Duke´s phytochemical and ethnobotanical databases. Green Farmacy Garden 8210 Murphy Rood. Fulton, MD 20759, USA. Dataset.

FAO/WHO. 2006. Probiotic in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Italy. FAO: Food and Nutrition. 85.

Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A.K. and Omid, M. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. Food and Bioproducts Processing. 90(4): 667-675. Doi: 10.1016/j.fbp.2012.04.006

França, D., Medina, F.A., Messa, L.L., Souza, C.F. and Faez, R. 2018. Chitosan spray-dried microcapsule and microcapsule and microsphere as fertilizer host for swellable-controlled release materials. Carbohydrate Polymers. 196(15): 47-55. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.014

Fragnant, H.S., Isidean, S.D., Wilson, L., Bukhari, A.S., Allen, J.T., Agans, R.T., Lee, D.M., Hatch-McChesney, A., Whitney, C.C., Sullo, E., Porter, C.K. and Karl, P.K. 2023. Orally ingested probiotic, prebiotic, and symbiotic interventions as countermeasures for gastrointestinal tract infections in nonelderly adults: A systematic review and meta-analysis. Advances in Nutrition. 14(3): 539-554. Doi: 10.1016/j.advnut.2023.02.002

Flores-Belmont, I.A., Palou, E., López-Malo, A. and Jiménez-Munguía, T. 2015. Simple and double microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with chitosan using spray drying. International Journal of Food Studies. 4: 188-200. Doi: 10.7455/ijfs/4.2.2015.a7

Granato, D., Barba, F.J., Kovačević, D.B., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G. and Putnik, P. 2020. Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. Annual Review of Food Science and Technology. 11: 93-118. Doi: 10.1146/annurev-food-032519-051708

Heleno, S.A, Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. and Ferreira, I.C.F.R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. Food Chemistry. 173: 501-513. Doi: 10. 1016/j.foodchem.2014.10.057

Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzynska, K. and Paz De Peña, M. 2016. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. European Food Research Technology. 242: 1403-1409. Doi: 10.1007/s00217-016-2643-y

Joya-Dávila, J.G., Gutiérrez-Miceli, F.A., Luján-Hidalgo, M.C., Serrano-Gómez, L. and Ruíz-Sesma, B. 2023. Cambios bioquímicos y morfométricos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo. Biotecnia. 25(3): 36-41. Doi: 10.18633/biotecnia.v25i3.1969

Liang, N., Xue, W., Kennepohl, P. and Kitts, D.D. 2016. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. Food Chemistry. 213: 251-259. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.041

López-Fernández, S.G., Fernández, M.S.G., Armenta, C.R.I., García-Galaz, A., Moreno-Rivas, S.C., Vázquez-Moreno, L. and Ramos-Clamont, M.G. 2019. Caracterización del co-encapsulamiento de *Lactobacillus plantarum* y ácidos grasos omega-3 en una matriz de alginato-pectina. Biotecnia. 21(2): 38-46. Doi: 10.18633/biotecnia.v21i2.904

Macheiner, L., Schmidt, A., Scheriner, M. and Mayer, H.K. 2019. Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. Journal of Food Composition and Analysis. 84: 1-8. Doi: 10.1016/j.jfca.2019.103307

Nader-Macías, M.E.F. and Juárez, T.M.S. 2015. Profiles and technological requirements of urogenital probiotics. Advanced Drug Delivery Reviews. 92(15): 84-104. Doi: 10.1016/j.addr.2015.03.016

Navarro-Flores, M.J., Ventura-Canseco, L.M.C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T.R. and Abud-Archila, M. 2020. Spray drying encapsulation of native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall. Journal of Food Science and Technology. 57: 4111-4122. Doi: 10.1007/s13197-020-04447-w

Odila, P.J., Soares, J., Sousa, S., Madureira, A.R., Gomes, A. and Pintado, M. 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. LWT-Food Science and Technology. 73: 543-550. Doi: 10. 1016/j.lwt.2016.06.060

Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Gancarz, M. and Szymańska, J. 2021. Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. Molecules. 26(4): 1-15. Doi: 10.3390/molecules26041172

Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Lagazzo, A., Botter, R. and Perego, P. 2015. Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: a study of operative parameters. LWT-Food Science and Technology. 62(1): 177-186. Doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.022

Piedrahíta, M.D.G., Fuenmayot, C.A. and Suarez, M.H. 2018. Effect of chitosan-propolis edible coatings in stability of refrigerated cachama (*Piaractus brachypomus*) vacuum-packed fish fillets. Packaging Technology and Science. 32(3): 1-11. Doi: 10.1002/pts.2422

Pupa, P., Apiwatsiri, P., Sirichokchatchawan, W., Pirarat, N., Muangsin, N., Ali, S.A. and Prapasarakul, N. 2021. The efficacy of three double microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. Scientific Reports. 11(13753): 1-9. Doi: 10.1038/s41598-021-93263-z

Ramírez-Balboa, G., Balois-Morales, R., León-Fernández, A.E., Bautista-Rosales, P.U., Jiménez-Zurita, J.O. and Montalvo-González, E. 2023. Physicochemical and proximal characterization of starch and flour of jicama (*Pachyrhizus erosus* L.). Revista Bio Ciencias, 10 (e1427): 1-17. Doi: 10. 15741/revbio.10.e1427

Ramírez-Pérez, J.I., Álvarez Gutiérrez, P.E., Luján Hidalgo, M.C., Ovando Chacón, S.L., Soria Guerra, R.E., Ruiz Cabrera, M.A., Grajales Lagunes, A. and 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 (7) 364. Doi: 10.1007/s00203-022-02984-w

Ramírez-Pérez, J.I., Abud-Archila, M., Ovando-Chacón, S.L., Soria-Guerra, R.E., Ruiz-Cabrera, M.A., Godínez-Hernández, C.I., and Grajales-Lagunes, A. 2023. Effect of coadministration of *Lactiplantibacillus fabifermentans* and linear/branched fructans mixtures on the intestinal health of Wistar rats. International Journal of Biological Macromolecules. 247, 125748. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125748

Ramos-Clamont, G., Hernández-González, L.E., Fernández-Michel, S.G., Froto-Madariaga, L. and Vázquez-Moreno, L. 2013. Estrategias para mejorar la sobrevivencia de probióticos en helados. Biotecnia. 15(2): 31-38. Doi: 10.18633/bt.v15i2.147

Reque, P.M. and Brandelli, A. 2021. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. Trends in Food Science & Technology. 114: 1-10. Doi: 10. 1016/j.tifs.2021.05.022

Rezazadeh, L., Gargari, B.P., Jafarabadi, M.A. and Alipour, B. 2019. Effects of probiotic yogurt on glycemic indexes and endothelial dysfunction markers in patients with metabolic syndrome. Nutrition. 62: 162-168. Doi: 10.016/j.nut.2018.12.011

Russo, M.I., Abeijón-Mukdsi, M.C., Santacruz, A., Ross, R., López, M.A., Gauffin-Cano, P. and Medina, R.B. 2022. Spray dried lactobacilli maintain viability and ferulotyl esterease activity

during prolonged storage and under gastrointestinal tract conditions. Journal of Food Science and Technology. 59: 1202-1210. Doi: 10.1007/s13197-021-05125-1

Salami, M., Kouchaki, E., Asemi, Z. and Tamtaji, O.R. 2019. How probiotic bacteria influence the motor and mental behaviors as well as immunological and oxidative biomarkers in multiple sclerosis? A double-blind clinical trial. Journal of Functional Foods, 52: 8-13. Doi: 10.1016/j.jff.2018.10.023

Semenova, M.G., Antipova, A.S. and Belyakova, L.E. 2002. Food protein interactions in sugar solutions. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 7(5-6): 438-444. Doi: 10.1016/S1359-0294(02)00079-1

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Estadística de Producción Agrícola. Datos Abiertos (siap.gob.mx).

Shekhar, T.C. and Anju, G. 2014. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. American Journal of Ethnomedicine. 1(4): 244-249.

Singleton, V.L., Orthofer, R., 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. Doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Varoquaux, P. and Wiley, R.C. 2017. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. F. Yildiz and R. Wiley (ed.), pp 153-186. Springer. Boston. Doi: 10.1007/978-1-4939-7018-6_5

Wong, C.H., Mak, I.E.K. and Li, D. 2021. Bilayer edible coating with stabilized *Lactobacillus plantarum* 299v improved the shelf life and safety quality of fresh-cut apple slices. Food Package Shelf Life. 30: 1-6. Doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100746

Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D.J., Xiao, H. and Li, L. 2019. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 19(2): 857-874. Doi: 10.1111/1541-4337.12532

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo original

Evaluación sensorial y de calidad de un prototipo de sorbete comestible con potencial nutracéutico

Sensorial and quality evaluation of an edible straw prototype with nutraceutical potential

Michelle Carolina Pazmiño[1,2,3], Claudia Inés Victoria-Campos[4], Vania Urias-Orona[5], Heriberto Castro[5] and Andrea Arreguín[4]

[1] Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias FICA, Ingeniería Agroindustrial y Alimentos, Universidad de las Américas UDLA, Quito, Ecuador.
[2] Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.
[3] Universidad Internacional Iberoamericana, Campeche, México.
[4] Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
[5] Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

RESUMEN

En un entorno natural, los sorbetes de plástico de un solo uso o desechables se desintegran en 500 años, mientras que los sorbetes comestibles, elaborados con ingredientes naturales, se disuelven en 40 minutos al entrar en contacto directo con la bebida. El propósito de este estudio fue desarrollar un prototipo de sorbete comestible con ingredientes de interés nutracéutico para el consumo de bebidas. Se diseñó un estudio experimental para determinar la dosis de inulina e isomalt conforme a las normas permitidas para el consumo humano, además, se llevo a cabo un análisis sensorial mediante una prueba de aceptación con escala hedónica de 7 puntos y un grupo focal para evaluar las cualidades del sorbete comestible. Los contenidos de inulina e isomalt en el sorbete fueron del 9.5 % y 30 %, respectivamente. Las calorías fueron de 379.98 kcal/100 g, con una diferencia de 14.83 kcal/100 g respecto a una fórmula con edulcorante 100 % calórico. Se evaluó la durabilidad a distintos niveles de pH en bebidas (ácido, neutro y alcalino). Tras 40 m de contacto directo con la bebida, no hubo diferencias entre los tres tratamientos. La aceptación del sorbete comestible por los panelistas/consumidores se vio reflejada por el tipo de bebida que se va a consumir (jugo de naranja y té frío comercial).

Palabras clave: Alimento funcional, inulina, isomalt, análisis sensorial.

ABSTRACT

In a natural environment, single-use or disposable plastic straws disintegrate over 500 years, whereas edible straws, made with natural ingredients, dissolve in 40 minutes when in direct contact with the beverage. This study aimed to develop an edible straw prototype with ingredients of nutraceutical interest for beverage consumption. We designed an experimental study to determine the dose of inulin and isomalt in compliance with the standards allowed for human consumption. We conducted a sensory analysis using a 7-point hedonic scale acceptance test and a focus group to assess the acceptance and qualities of the edible straw. The inulin and isomalt contents in the straw were 9.5 % and 30 %, respectively. Calories were 379.98 kcal/100 g, with a 14.83 kcal/100 g difference from a formula with 100 percent caloric sweetener. We evaluated durability at different pH levels of beverages (acid, neutral, and alkaline). After 40 m of direct contact with the beverage, there was no difference between the three treatments. The panelists and consumers reflected on their acceptance of the edible straw in the type of beverage they consumed (commercial orange juice and tea).

Keywords: functional food, inulin, isomalt, sensory analysis.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos de un solo uso, se les conoce también como desechables y fueron diseñados para usarlos una sola vez con un tiempo de vida corto, no son biodegradables (Proyecto de Ley 080 de 2019) . En el 2019, los sorbetes producían aproximadamente el 4 % de basura a nivel mundial (Plastivida, 2017). En la actualidad ya no hay capacidad para enfrentar a estos desechos de plásticos, ya que sobrepasan en su producción y uso, solamente se recicla el 9% de 9000 millones de toneladas de fabricación de plástico, si no existe un cambio, en el 2050 la producción será de 12000 millones y se desecharán en basureros, en espacios naturales en fragmentos de microplásticos, dificultando el proceso de reciclaje. Además, la fabricación de este polímero demanda el 20 % de la producción global de petróleo (ONU Medio Ambiente, 2018).

Una de las alternativas para sustituir el consumo de plásticos de un solo uso, son aquellas ideas renovables y compostables, las cuales contribuirán en parte, a solucionar la problemática de la contaminación que generan los plásticos suaves o de un solo uso. Hoy en día la industria alimentaria ha ido incorporando el concepto de alimento funcional en el desarrollo de alimentos para satisfacer las necesidades principales del consumidor relacionado a los nutrientes y sustancias bioactivas para el cuerpo, con efectos benéficos en la salud y bienestar (Restrepo Flórez *et al*., 2017).

*Autor para correspondencia: Andrea Arreguin
Correo-e: andrea.arreguin@uaslp.mx.
Recibido: 7 de junio de 2024
Aceptado: 14 de septiembre de 2024
Publicado: 7 de octubre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2340

En este sentido, los agentes bioactivos son los componentes biológicos del alimento funcional y se les conoce como un suplemento dietético, se pueden administrar de manera concentrada o adicionar a un alimento, para incrementar sus funciones, generando los nutracéuticos (Valenzuela *et al*., 2014; Restrepo Flórez *et al*., 2017). Dentro de los agentes bioactivos de interés encontramos a la inulina y al isomalt. La inulina es una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos compuestos por unidades de fructosa unidas por enlaces beta con una molécula final de glucosa; este polímero tiene propiedades antioxidativas, antibacterianas, hipocolesterolémicas, anticarcinogénicas, antiinflamatorias, entre otras (Restrepo Flórez *et al*., 2017; Ahmed y Rashid, 2019). El uso de inulina en productos alimenticios fue aprobado por la FDA en 1992 (Roberfroid, 2001). La inulina se usa comúnmente para incrementar el contenido de la fibra dietética en alimentos, en intervalos de 3 a 6 g por cada porción y se puede llegar hasta 10 g, se debe de tomar en cuenta que la cantidad mínima de inulina para que sea considerada fuente de fibra en los alimentos depende de la legislación en cada país (Ministerio de la Protección Social, 2011). Existen diversos estudios, que recomiendan una ingesta de 20-35 g/día con proporción de 3/1 entre fibra insoluble y soluble (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Dentro de la industria alimentaria, se usa como sustituto del azúcar, reemplazo de grasa, estabilizador en emulsiones y espumas, posee un sabor neutral, es soluble en agua y tiene la función de otorgar cuerpo y palatabilidad (Murillo *et al*., 2016). Por otra parte, el isomalt, es un edulcorante artificial sin calorías, el cual fue descubierto en el año de 1960, está conformado por sacarosa y mezcla de dos alcoholes disacáridos: Glucosorbitol y Glucomanitol, físicamente es similar a la sacarosa (azúcar de mesa) por su color blanco, inodoro y cristalino. Posee varias funciones que son beneficiosas para la salud, siendo este un ingrediente versátil para alimentos y medicamentos con bajo nivel de calorías (Calorie Control Council, 2021). En la industria alimentaria el isomalt tiene la función de activarse, es decir, fundirse sin la presencia de un líquido, puede soportar la humedad y alcanza temperaturas de hasta 160 °C, sin tener cambios en su color (Garrido, 2018). En los alimentos se usa como edulcorante, humectante, estabilizante y espesante. El uso de este ingrediente se ha aprobado en más de 80 países en el mundo (Calorie Control Council, 2021).

En base a que los consumidores buscan aumentar el conocimiento sobre la relación entre dieta y salud (Cruzado y Cedrón, 2012), esta investigación se ha centrado en el desarrollo de un sorbete comestible con ingredientes de interés nutracéutico y funcional para bebidas que se sirvan y consuman a temperatura ambiente (23 ° C) y temperatura fría (7-11 °C).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ingredientes

Los aditivos alimentarios fueron almidones, hidrocoloides, inulina e isomalt (Innovapec.ec, localizada en Quito - Ecuador), almacenados a una temperatura ambiente de 23 °C y libre de humedad. Todos los ensayos de producción se llevaron a cabo en una planta de procesamiento de alimentos de Innova Future Food, ubicada en Quito, Ecuador.

Diseño experimental

Para el desarrollo de la fórmula (en fase de pantente) del sorbete comestible, se llevó a cabo una investigación basada en procesos de confitería y se elaboraron dos fórmulas (Tabla 1). El procedimiento general para la formulación del sorbete comestible se describe a continuación:

Se preparó la mezcla, de acuerdo con los estándares de inulina e isomalt permitidos para el consumo humano (Roberfroid, 2001; Norma Técnica Ecuatoriana, 2013; Suarez-Diéguez *et al*., 2014; Traub-Ramos, 2014). En el proceso de extrusión, la mezcla fue sometida a una temperatura de 30 a 40 °C, para darle la forma del cilindro hueco. Posteriormente se realizó un proceso de pre-secado con aire frío de 0 a 23 °C en un intervalo de tiempo de 30 min, el secado se realizó en una cabina cerrada prototipo, adaptada para controlar la temperatura de 5 °C a 18 °C con aire frío, eliminando la mayor cantidad de actividad de agua. Para luego realizar el cortado del sorbete comestible. El sorbete se empacó en fundas de papel biodegradables tipo Kraft y fue almacenado en envases con cierre hermético para evitar que exista presencia de humedad (Figura 1).

Para la prueba cualitativa (Ramírez-Navas, 2012) los sorbetes elaborados con diferentes dosis de inulina (10 – 15 %) e isomalt (35 - 50 %) fueron evaluados por 18 panelistas no entrenados mediante dos grupos focales en una discusión guiada. La participación fue de manera voluntaria. En la prueba, se proporcionó un par de muestras a cada panelista y, a continuación, se preguntó a los panelistas por la aceptabilidad, durabilidad en la bebida en un tiempo de 40 min sin cambiar de forma, color (transferencia de color a la bebida), migración de sabor (transferencia de dulzor a la bebida) e intención de compra. La aceptabilidad, textura, color y migración de sabor se evaluó en una escala de categorías compuesta por 7 puntuaciones: 1 (extremadamente desagradable), 2 (desagradable), 3 (ligeramente desagradable), 4 (ni agradable ni desagradable), 5 (ligeramente agradable), 6 (agradable) y 7 (extremadamente agradable). Además, se pidió a los panelistas que evaluaran su intención de compra en una escala de categorías compuesta por 5 puntos: 1 (defi-

Table 1. Edible sorbet formulation[1].
Tabla 1. Formulación del sorbete comestible[1].

Muestra	Descripción	Azúcar (%)	Inulina (%)	Isomalt (%)
A	Control (con azúcar)	70	-	-
B	No azúcar	-	9.5	30

[1] Cada formulación se repitio dos veces. El total de azúcar en la muestra A fue de 70%. Se utilizaron ingredientes secos (almidones) e ingredientes húmedos (agentes aromatizante y colorantes). Peso neto en 10 gramos.

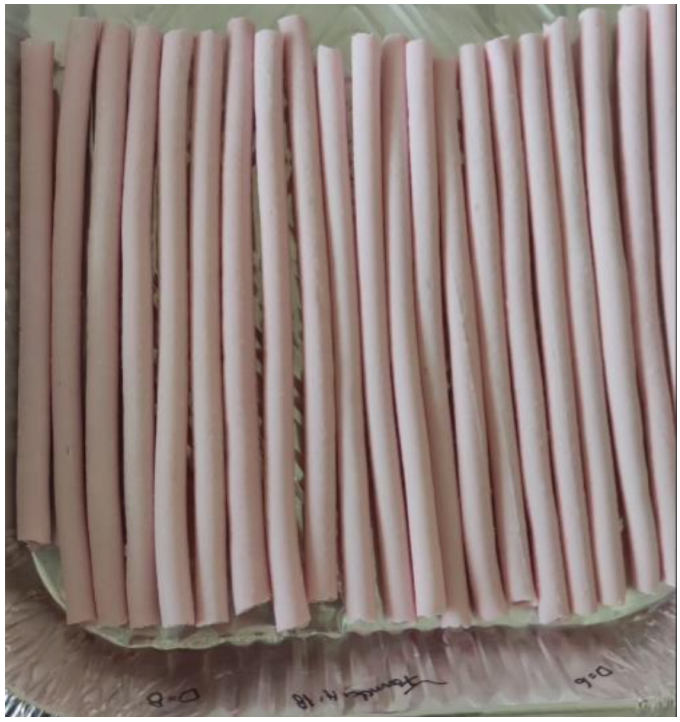


Figura 1. Edible sorbet image – prototype.
Figure1. Imagen de sorbete comestible – prototipo.

nitivamente no compraré), 2 (probablemente no compraré), 3 (no estoy seguro), 4 (probablemente compraré) y 5 (definitivamente compraré).

Basandose en las preferencias de los panelistas se determinó el valor de inulina e isomalt de las muestras y se prepararon dos formulaciones (Tabla 1). Posteriormente, se analizó la composición, durabilidad y análisis sensoriales del sorbete (Pérez-Cabrera *et al*,. 2012; Estrada-López *et al*., 2017; Garrido, 2018).

Análisis de composición

La determinación de la composición del sorbete se realizó mediante el método gravimétrico en el laboratorio Ecuachemlab ubicado en Rumiñahui-Ecuador. En este proceso se analizó la cantidad de grasa, húmedad, fibra bruta, ceniza, proteína y carbohidratos (Plastivida, 2017; Proyecto de Ley 080 de 2019).

Para determinar la cantidad de calorías que aporta el sorbete comestible, se usó el método del calorímetro, donde las muestras se sometieron a una temperatura caliente y así se estimó el aporte calórico del sorbete, comparando con un patrón con sacarosa (Ramírez de León *et al*., 2013).

Análisis de durabilidad

Para evaluar la durabilidad del sorbete comestible se sometió a diferentes bebidas durante 40 m (Tabla 2). La durabilidad se definió como la presión de medición de ± 0.5% expresado en kilogramos de fuerza y se determinó utilizando el penetrómetro KRAFT MESSENGER PCE-FM200®, Albacete, España.

Table 2. Beverages at different pH and temperatures.
Tabla 2. Bebidas con diferentes pH y temperaturas.

Bebidas	pH	Temperatura
Jugo de naranja comercial	3.52	11.6 °C
Agua	6.92	21 °C
Té frío comercial	8.25	7 °C

Pruebas de análisis sensorial cuantitativo

Las características sensoriales de las muestras, incluidos aceptabilidad, durabilidad en la bebida en un tiempo de 40 min sin cambiar de forma, color (transferencia de color a la bebida), migración de sabor (transferencia de dulzor a la bebida) fueron evaluadas por 95 personas adultas (entre un rango de 11 a 21 años) (Aguilar- Barojas, 2005). La migración se definió como la transferencia de componentes desde el alimento al medio durante su consumo (Navia *et al*., 2014). La prueba de análisis sensorial cuantitativa de consumo y el método de análisis se realizó según (Ramírez-Navas, 2012). Estas pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos de la Universidad de las Américas (UDLA) de Quito, Ecuador, previa firma de consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el comité de etica con número de registro NºCR-229.

Análisis estadístico

Se usó el programa JASP versión gratuita, para realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, en la variable de durabilidad de los sorbetes comestibles en bebidas sometidas a una temperatura de 7 a 23 °C. La aceptación en la evaluación sensorial se analizó por medio del análisis de Kruskal- Wallis. Todos los análisis se realizaron considerando una probabilidad de error del 0.05 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se realizó la prueba preliminar de preferencia y aceptación del consumidor para determinar la migración de sabor del sorbete (transferencia de dulzor a la bebida) según la preferencia de los consumidores. Los resultados mostraron que el 90% de los panelistas preferían la muestra con menor migración de sabor en bebidas como el agua en comparación con el té frío comercial y jugo de naranja comercial (datos no mostrados). Como la preferencia de los panelistas era estadísticamente significativa ($p < 0.05$), el porcentaje de inulina de las muestras se ajustó a 9.5 % e isomalt a 30 % en las siguientes fases del estudio. Se sabe que el valor de inulina e isomalt en productos de confitería se encuentra dentro de un rango de 3 a 10 g y, de 20 a 30 g, respectivamente, según la preferencia del consumidor y las legislaciones actuales (FDA, 2013; Norma técnica ecuatoriana, 2013).

De forma similar a nuestros resultados, la revisión de (González-Herrera *et al*., 2015) demostró que las puntuaciones sensoriales totales más altas en productos alimenticios correspondían a muestras con rango de inulina de 2 a 10 %. Además, el isomalt por término medio, contiene entre el 45 % y el 65 % del dulzor de la sacarosa, sin embargo, su dulzor

varía con la temperatura, concentración y tipo de producto (Ibrahim, 2016). La intención de compra del sorbete se situó entre 4 (probablemente comprar) o 5 (definitivamente comprar) en una escala de categorías (datos no mostrados).

Se determinó la composición de las formulaciones en 100 g de muestra (Tabla 3). Según los resultados, el contenido medio total de grasa de las muestras de control (A) y el sorbete (inulina e isomalt) (B) fue de 0.93 y 0.34 %, respectivamente. El contenido medio de proteínas, cenizas e hidratos de carbono de la muestra de control fue de 2.35, 0.25 y 94.26 %, respectivamente. En comparación con la muestra B que presentó un 1.80 %, 0.23 % y 1.80 %, respectivamente. La muestra de sorbete tenía un valor energético de 3.76 % (14.83 kcal/100g) inferior en comparación con la muestra de control (B; Tabla 3), lo que pudiera beneficiar a los consumidores debido a que el isomalt es un poliol que se digiere parcialmente en el intestino, aportando sólo la mitad del valor calórico de la sacarosa (Msomi *et al*., 2021). La humedad de las muestras se situó entre 2.21 % y 5.20 % para la muestra A y B, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro de los rangos de humedad para productos de confitería a base de isomalt (6.5 a 8 %p/p) y una textura masticable (Elejalde *et al*., 2014). En general, la composición del sorbete comestible permite que soporte un amplio rango de pH a temperaturas entre 7 y 23 °C, permitiendo que se mantenga estable durante 40 m en inmersión, lo anterior, debido a que su fórmula es equilibrada en insumos con diferentes funciones tecnológicas que aportan características físicas y sensoriales.

La durabilidad del sorbete se determinó en bebidas a temperaturas entre 7 a 23 °C en un periodo de 40 min (Tabla 4 (a)). Se observó que la durabilidad del sorbete comestible en agua presentó significancia (P < 0.015) lo que indica que tiene una mayor resistencia a la ruptura que el sorbete comestible en té frío y en jugo de naranja comercial. El agua es un solvente el cual disuelve al soluto (edulcorante) debido a las fuerzas de atracción, ocasionando que las partículas del soluto se separen y se mezclen en el agua (Nelson y Cox, 2009). Es por ello, que al pasar el tiempo de inmersión en la bebida el sorbete disminuye su fuerza a una media de 0.844. Posiblemente debido a que la inulina disponible en el sorbete confiere textura y firmeza, ya que cuenta con propiedades similares al almidón, al formar geles por procesos térmicos (Lara-Fiallos *et al*., 2017).

Table 3. Edible sorbet composition.
Tabla 3. Composición del sorbete comestible.

Composición de las formulaciones			
Parámetros	**A**	**B**	**Método de análisis de referencia**
Grasa (%)	0,93	0,34	AOAC 2003. 06
Humedad (%)	2,21	5,20	AOAC 925.10
Fibra Bruta (%)	0,00	0,00	INEN 522
Ceniza (%)	0,25	0,23	AOAC 923.03
Proteína (%)	2,35	1,80	AOAC 2001.11
Carbohidratos (%)	94,26	92,43	PA-FQ-56
Calorías (kcal/ 100 g)	394,81	379,98	PA-FQ-54

Control y (B) sorbete inulina e isomalt.

Table 4. Durability analysis and sensory tests.
Tabla 4. Análisis de durabilidad y pruebas sensoriales.

Atributo	Tratamiento		
	Jugo de Naranja comercial	**Té frío comercial**	**Agua**
(a)Durabilidad (kg)	0.84 ± 0.25	1.22 ± 0.93	1.23 ± 0.93*
Análisis sensorial			
(b) Apariencia	6.12 ± 1.05	5.85 ± 1.05	5.93 ± 0.97
(c) Durabilidad (%)	5.56 ± 1.47	5.92 ± 1.35	5.45 ± 1.17
(d) Color	6.26 ± 1.40	6.24 ± 1.26	5.76 ± 1.30
(e) Migración de sabor	6.26 ± 1.03	6.24 ± 1.26	5.47 ± 1.74

(a) Durabilidad expresada como la presión de medición - kg (+) medida por penetrómetro KRAFT MESSGERA PCE-FM200®. Prueba Tukey (n = 30 por grupo) (p < 0.05).
Prueba Kruskal Wallis con determinación de análisis de ANOVA descriptivo de la apariencia, durabilidad, color y migración de sabor del sorbete comestible aplicado en bebidas (n = 95 por grupo). (b) Apariencia entre bebidas (jugo de naranja comercial, té frío comercial y agua) de (X2 = 5.345, p 0.069); (c) Durabilidad (%) entre bebidas (jugo de naranja comercial, té frío comercial y agua) de (X2 = 11.499, p 0.003); (d) Color entre bebidas (jugo de naranja comercial, té frío comercial y agua) de (X2 = 18.249, p < 0.001); (e) Migración de sabor entre bebidas (jugo de naranja comercial, té frío comercial y agua) de (X2 = 14.080, p < 0.001).

En la Tabla 4 (b, c, d y e) observamos los resultados del análisis sensorial respecto a la apariencia, durabilidad, color y migración de sabor, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la apariencia del sorbete comestible (p = 0.069) lo que indica que esta no se ve influenciada significativamente en los tratamientos aplicados. Sin embargo, el sorbete en jugo de naranja comercial presentó la media más alta (Md = 6.126). El jugo de naranja comercial es una de las bebidas que más se consume con sorbete, por eso fue muy familiarizada por los panelistas (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2019). Por otra parte, si se encontraron diferencias significativas en cuanto a la durabilidad (p = 0.003). El sorbete en té frío comercial, presentó la media más alta (Md = 5.926). También se encontraron diferencias significativas respecto al color, evaluado por la transferencia de color del sorbete a la bebida (p < 0.001). El sorbete en jugo de naranja comercial presento la media más alta (Md = 6.263). La percepción oral del atributo de durabilidad depende de la masticación y las propiedades mecánicas y reológicas, determinando la deformación y fractura en partículas del producto que se evalúa (López-Manterola, 2019). La durabilidad del sorbete comestible fue mayor en el tratamiento con té frío comercial, ya que, después de los 35 minutos, continuó con una textura rígida, no se identificó degradación del sorbete, debido a que el color de la bebida se mantuvo hasta los 40 minutos en inmersión, en comparación con los tratamientos en jugo de naranja comercial y agua. También se presentaron diferencias significativas en relación con la migración de sabor del sorbete comestible en la bebida (P < 0.001), es decir, la migración del sabor en la bebida se ve influenciada significativamente en los tratamientos aplicados. El sorbete en jugo de naranja comercial presentó la media

más alta (Md = 6.263). Actualmente existen sorbetes biodegradables en el mercado, que no tienen migración de sabor, son comestibles y tienen una duración de 40 m en bebidas (Sorbos, 2022; Edible Straw, 2024). La diferencia con nuestro sorbete es que este contiene productos nutraceúticos como la inulina, que en personas con obesidad puede ayudar a la reducción del contenido calórico diario (Abed *et al*., 2016) e isomalt que tiene efectos anticariogénico y no aumenta los niveles de glucosa o insulina en sangre (Msomi *et al*., 2021). También, se han desarrollado sorbetes comestibles a partir de ingredientes naturales, gelatina agar-agar, masa elástica, saborizantes, colorantes, almidón de maíz y Stevia, elaborados artesanalmente en mercado peruano, el cual aun no ha sido explotado, por debilidad en maquinaria (Aguilar *et al*., 2018).

El sorbete comestible debe de poseer características específicas para que sean aceptadas por los consumidores como son apariencia lisa, uniformidad en el color, poca o nula migración de sabor. En este sentido, el sorbete comestible inmerso en té frío comercial y jugo de naranja comercial tuvo una mayor acpetación respecto a la migración del sabor por parte de los panelistas. No obstante, cuando se presentó con agua, la aceptación fue menor debido a que el sorbete cambio de color y tuvo mayor migración de sabor. Esto pudo deberse a que el sorbete presentaba una coloración azul, la cual comenzó a desprenderse en la bebida y el agua tomó esta coloración, los panelistas sugirieron que el sorbete debe de ser comestible neutro y sin color para usarlo en agua.

El Instituto de Estadística y Censos (INEC), en el informe emitido en el 2018, los ecuatorianos arrojan 12.739,01 toneladas de basura diarias, tomando en cuenta que el 11.43 % es plástico, representando a 531,461 ton y de esto 265,730 toneladas son plásticos suaves o de un solo uso como; fundas, recipientes, sorbetes, considerando que su reciclado es nulo (Aguilar *et al*., 2018). Es por ello que, el consumo de bebidas con sorbete comestible podría ser una solución a que contribuya a este problema ambiental.

CONCLUSIONES

El uso de sorbetes comestibles con ingredientes activos para el consumo de bebidas, es una solución al problema del uso de plásticos de un solo uso, conocidos como desechables, diseñados para usarlos una sola vez. En esta investigación se diseñó un sorbete comestible cilíndrico-alargado, para que la bebida líquida pueda ser canalizada a la boca del consumidor, con una duración de 40 minutos, en una bebida a temperatura de 7 a 23 °C, sin que este libere color, aroma o matizar las características organolépticas de la bebida. El sorbete presentó un sabor agradable al paladar, por lo que la formulación planteada tiene un uso potencial y beneficios en la salud y en el ambiente. La inulina es una fibra insoluble con una amplia actividad reportada por su funcionalidad como prebiótico, por lo que su incorporación a alimentos y productos comestibles podría contribuir a la mejorar la salud intestinal y metabólica de los consumidores. Futuros estudios podrían evaluar la estabilidad de la inulina al proceso de elaboración del sorbete y la bioactividad del prototipo de sorbete presentado en el presente estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abed, S., Ali, A.H., Noman, A. y Bakry, A.M. 2016. Inulin as prebiotics and its applications in food industry and human health; A review. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 5(1): 2319-1473.

Aguilar-Barojas, S. 2005. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco. 11(1-2): 333-338.

Aguilar, P., Collantes, D., Penadillo, E., Pasapera, A. y Gálvez, G. 2018. Sorbetes comestibles. Trabajo de Investigación para optar el Grado Académico de Bachiller. Universidad San Ignacio de Loyola. Lima, Perú.

Ahmed, W. y Rashid, S. 2019. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 59(1): 1-13.

Calorie Control Council. Isomalt. 2021. [Consultado 7 Marzo 2024] Disponible en: https://datossobrelospolioles.com/isomalt/.

Congreso de la República de Colombia. Proyecto de Ley 080 de 2019. [Consultado 2 Enero 2024]. 2019. Disponible en: http://leyes.senado.gov.co/proyectos/index.php/textos-radicados-senado/p-ley-2019-2020/1543-proyecto-de-ley-080-de-2019.

Cruzado, M. y Cedrón, J. C. 2012. Nutracéuticos, alimentos funcionales y su producción. Revista de Química. 26(1-2): 33-36.

Edible Straws. Edible Straws - Edible Straws. [Consultado 15 Enero 2024] 2024. Disponible en: https://ediblestraw.au/.

Elejalde, C.C., Jani, B., Levenson, D., May, J., Robinson, M.K., Schmitz, K., Shetty, A., O'neill, S.A., Hirt, W.J. y Euan, D. 2014. Productos de confitería a base de Isomalt sin azúcar y métodos para su producción. España. Patente 07.10.2014.

Escudero-Álvarez, E., y González-Sánchez, P. 2006. La fibra dietética. Nutrición Hospitalaria. 21(2), 61-72.

Estrada-López, H.H., Saumett-España, H.G., Iglesias-Navas, M.A., Bhamón M.J., Cáceres-Martelo, A.M., Restrepo-Flórez C.E., Pérez-Lavalle, L., Bolíar-Anillo, H.J., Díaz-Pérez, A. 2017. Productos de confitería nutracéutica y biofertilizantes: una opción empresarial para cultivadores de frutas y hortalizas. Ediciones Univerisidad Simón Bolívar, Colombia.

Garrido, J.M. 2018. Elaboraciones básicas de repostería y postres elementales.1ª edición. Ideasporpias editorial, Vigo, España.

González-Herrera, R.R., Rodríguez-Herrera, R., López, M.G., Rutiaga, O.M., Aguilar, C.N., Contreras-Esquivel, J.C. y Ochoa-Martínez, L.A. 2015. Inulin in food products: prebiotic and functinal ingredient. British Food Journal. 117(1): 371-387

Ibrahim, O.O. 2016. Sugar alcohols: chemical structures, manufacturing, properties and applications. EC Nutrition. 4(2): 817-824.

Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2019. Instituto Nacional de Estadística y Censos. [Consultado 3 Septiembre 2022] 2019. Disponible en: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home/

Lara-Fiallos, M., Lara-Gordillo, P., Julián-Ricardo, M.C., Pérez-Martínez, A. y Benítes-Cortés, I. 2017. Avances en la producción de inulina. Tecnología Química. 37(2): 220-238.

López-Manterola, B. 2019. Caracterización de la percepción oral de la textura de seis alimentos sólidos. Proyecto Fin de Carrera / Trabajo Fin de Grado, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM), Madrid.

Ministerio de la Protección Social. Resolución 333 de 2011. [Consultado 2 Nobiembre 2023]. Disponible en: https://faolex.fao.org/docs/pdf/col111552.pdf

Msomi, N.Z., Erukainure, O.L. y Islam, M.S. 2021. Suitability of sugar alcohols as antidiabetic supplements: A review. Journal of Food and Drug Analysis. 15;29(1):1-14.

Murillo, K., Velasquez-Orozco, I., Ortega, D. y Ramírez-Nava, J. 2016. Empleo de inulina en matrices alimentarias. Revisión. La Alimentación Lationamericana. 325: 62-68.

Navia, D.P., Ayala, A.A. y Villada, H.S. 2014. Interacciones empaque-alimento: migración. Revista Ingenierías Universidad de Medellín. 13(25): 99-113.

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN-CODEX 192:2013 INEN. Norma General del Códex para los Aditivos Alimentarios (MOD). [Consultado 5 Enero 2024] 2013. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/leisref/2018/03/290/alcohol-192-codex-unido.pdf

Nelson, D.L. y Cox, M.M., 2009. Lehninger principios de bioquímica. 5a. ed. Ediciones Omega.

ONU Medio Ambiente. 2018. El estado de los plásticos Perspectiva del día mundial del medio ambiente 2018. [Consultado 7 Diciembre 2022] 2018. Disponible en: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25513/state_plastics_WED_SP.pdf?isAllowed=y&sequence=5.

Plastivida. Entidad Técnica Profesional Especializada en Plásticos y Medio Ambiente. 2017. Plásticos: su origen y su relación con el medio ambiente. [Consultado 20 Enero 2023] 2017. Disponible en: http://ecoplas.org.ar/pdf/3.pdf.

Pérez-Cabrera, L.E., Reyes-Bernal, K., Godines-Hoyos, A. y Casillas-Peñuelas, R. 2012. Desarrollo y caracterización de golosinas con ingredientes de interés nutrimental. CienciaUAT. 6(3): 50-55.

Ramírez- Navas, J. S. 2012. Análisis sensorial: Pruebas orientadas al consumidor. ReCiTeIA. 12 (1): 84-102.

Ramírez de León, J.A., Uresti, R.M., Aldana, M.L. y Loarca, M.G. 2013. Avances de Ciencia y Tencología alimentaria en México. Plaza y Valés. Madrid, España.

Restrepo Flórez, C.E., Estrada-López, H.H., y Saumett-España, H.G. 2017. Nutracéuticos y alimentosfuncionales: una revisión de oportunidades. En: Productosde confitería nutracéutica. Una opción empresarial para cultivadores de frutas y hortalizas. H.H. Estrada-López, H.G. Saumett-España, M.A. Iglesias-Navas, M.J. Bahamón, A.M. Cáceres-Martelo, C.E. Restrepo Flórez, A. Díaz Pérez (ed.), pp.141-178. Universidad Simón Boliva, Barranquilla, Colombia.

Roberfroid, M.B. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs?. American Journal of Clinical Nutrition. 73(2):406S-409S.

Sorbos. Sorbos - Sorbos. [Consultado 4 Febrero 2024] 2022. Disponible en: https://wearesorbos.com/producto/sorbos/#detalles-del-producto

Suarez-Diéguez, T., González- Escalante, E., Reséndiz- Martínez, Y. y Sánchez-Martínez, D. 2014. La importancia de los aditivos alimentarios en los alimentos industrializados. Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2(4).

Traub-Ramos., A.J. 2014. Achicoria: precursora de la inulina. Ministerio de Agricultura del Gobierno de Chile. [Consultado 6 Noviembre de 2023] 2014. Disponible en: doi:https://hdl.handle.net/20.500.12650/2629.

US Food and Drug Administration (FDA). 2013. Everything added to food in the United States (EAFUS). [Consultado 6 Noviembre de 2023] 2013. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnnavigation.cfm?rpt=eafuslisting

Valenzuela, B.A., Valenzuela, R., Sanhueza, J. y Morales I, G. 2014. Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?. Revista Chilena de Nutrición. 41(2): 198-204.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Predominancia de especies forestales y asociación de hongos fitopatógenos en árboles de la Ciudad de México

Predominance of forest species and association of phytopathogenic fungi in trees of Mexico City

José Francisco Reséndiz Martínez[1], Mónica Gutiérrez-Rojas[2*], Pablo Preciado-Rangel[3], Ana Lilia Viveros Muñoz[4], Daniel Ruiz-Juárez[2*]

[1] Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.

[2] Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México. CP. 04960. México.

[3] Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Torreón. Antigua Carretera Torreón-San Pedro km 70.5, ejido Ana 27170 Torreón, Coahuila, México.

[4] Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

ABSTRACT

The objective was to determine the prevalence of forest species and identify phytopathogenic fungi in trees in CDMX. The trees were delimited to the Parque 18 de Marzo, based on the distribution of parks and gardens with native and introduced vegetation. From 2018 to 2020, diseased plant tissues were sampled and collected from tree species. The classification was through the manual of botanical species of the Valley of Mexico and the identification of fungi with taxonomic keys. We found 25 botanical families with significant differences ($p \leq 0.05$) in the diversity of native (39.51 %) and introduced (60.49 %) species. Leaves, shoots and branches presented leaf spots, chlorosis, cankers, death of vascular tissue, powdery mildew and rust. The degree of affectation with the highest impact on health and quality of the trees were by *Kirramyces epicoccoides*, *Aspergillus niger*, *Tubercularia* sp. and *Alternaria alternata* (2.34, 2.58, 5.74 and 6.80 %, respectively). The cumulative incidence of cases registered in trees was 17.46 %. *Ulmus parvifolia* expressed greater epidemiological increase. *A. alternata* had a significant impact on population dynamics. The incidence of phytopathogenic fungi in tree species evidenced the general phytosanitary status that CDMX trees represent, which will allow establishing management measures for specific diseases.

Key words: Cumulative population dynamics, phytosanitary status, cumulative incidence.

RESUMEN

El objetivo fue determinar la prevalencia de especies forestales e identificar hongos fitopatógenos en árboles de CDMX. El arbolado se delimitó en el Parque 18 de marzo a partir de la distribución de parques y jardines con vegetación nativa e introducida. De 2018 - 2020 se muestrearon especies arbóreas y se recolectó tejido vegetal enfermo, la clasificación se realizó mediante el manual de especies botánicas del Valle de México y la identificación de hongos con claves taxonómicas. Se encontraron 25 familias botánicas con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la diversidad de especies nativas (39.51 %) e introducidas (60.49 %). Hojas, brotes y ramas presentaron manchas foliares, clorosis, cancros, muerte de tejido vascular, cenicillas y royas. El grado de afectación con mayor incidencia en sanidad y calidad del arbolado fue *Kirramyces epicoccoides*, *Aspergillus niger*, *Tubercularia* sp. y *A. alternata* (2.34, 2.58, 5.74, 6.80 %, respectivamente). La incidencia acumulada de casos registrados en arbolado fue del 17.46 %. *Ulmus parvifolia* expresó mayor aumento epidemiológico. *A. alternata* tuvo impacto significativo en la dinámica poblacional. La incidencia de hongos fitopatógenos en especies arbóreas evidenció el estatus fitosanitario general que representa el arbolado de CDMX, lo que permitirá establecer medidas de manejo de enfermedades específicas.

Palabras clave: Dinámica poblacional acumulada, estatus fitosanitario, incidencia acumulada.

INTRODUCCIÓN

La superficie forestal del mundo corresponde a 4 058 millones de ha, de esta superficie, México cuenta con 66.7 millones de ha de selva y bosque templado (FAOSTAT, 2021) y esto representa el 48.1 % de la superficie forestal nacional (CONAFOR, 2023). Las estadísticas del INEGI (2021) enfatizan, que en los últimos años la población forestal que integra los bosques, parques y jardines ha incrementado 25.1 % de la vegetación nacional, sin embargo, los ecosistemas en áreas forestales pueden afectarse debido a la interacción de factores microbiológicos (Cibrián, 2016), en este sentido, la FAO (2018) confirmó que, a partir de 75 países registrados con índice forestal, el 70 % de la superficie forestal es afectada por problemas fitosanitarios. Así mismo, en los países del Centro y Norte de América, 58 millones de ha de bosques forestales fueron afectadas por enfermedades (FAOSTAT, 2021). En México, en 2022 el SIVICOFF (2023) encontraron 8 420 ha de bosque alteradas por problemas fitosanitarios. De esta superficie, 2 467 ha manifestaron epidemias en el área foliar, tallo o raíz causadas por microorganismos. Sin embargo, Cervantes *et al*. (2019) mencionan que la distribución espacial de áreas forestales enfermas en parques y jardines es incierta.

*Autor para correspondencia: M. Gutiérrez-Rojas; D. Ruiz-Juárez
Correo-e: mgutierrez@correo.xoc.uam.mx; druiz@correo.xoc.uam.mx
Recibido: 17 de septiembre de 2023
Aceptado: 3 de abril de 2024
Publicado: 2 de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2156

También, Reséndiz-Martínez *et al*. (2019) confirman que el inventario de enfermedades en áreas boscosas y parques con jardín de la Ciudad de México (CDMX) es limitado. La CONAFOR menciona que en los pocos estudios que abordan la patología vegetal de áreas verdes de las grandes urbes, los principales hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en el arbolado son *Tubercularia* sp. (Tode) Fr., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Fusarium oxysporum* Schltdl., *F. solani* (Mart.) Sacc., *Phytophthora cinnamomi* Rands., *Verticillium alboatrum* Kleb, 1950, *Phymatotrichopsis omnivora* (Shear) Duggar (1916), *Armillaria* spp. (Fr.) Staude, *Botryosphaeria* Ces. & De Not y *Phomopsis* spp. (Sacc.) Bubák 1905, en este sentido, la Comisión ratifica que en algunas entidades federativas de México se cuenta con el registro de hongos causantes de enfermedades en los ecosistemas forestales (CONAFOR, 2007). La biodiversidad de hongos fitopatógenos en los sistemas forestales causa alteraciones fisiológicas en las estructuras botánicas del arbolado (Cibrián-Tovar *et al*., 2008). De acuerdo con Balla *et al*. (2021) en los suelos forestales se encuentra la mayor diversidad de habitantes microbianos, por gramo de suelo se observan 0.7 mg de micelio de hongos, además, el desarrollo de hongos fitopatógenos en un ecosistema forestal es heterogéneo, debido a que habitan en el suelo, follaje, de forma endófita en las estructuras internas del área foliar, tallo y radícula de la planta. Algunas especies pueden presentar estructuras de resistencia o sobrevivencia a condiciones adversas, se dispersan y se adaptan a diferentes ambientes, lo que favorece la reproducción del patógeno, además, de propagarse a zonas arbóreas libres de enfermedades. En bosques nativos e introducidos afectan millones de árboles cada año, principalmente las especies no nativas amenazan a los bosques porque tienen poco control natural, el ambiente puede ser favorable para la proliferación y la incidencia de brotes puede ser devastadora causando daños ecológicos y económicos.

De acuerdo con Sosa *et al*. (2018), las alteraciones climáticas influyen en la dinámica poblacional de los hongos fitopatógenos, mismos que se adaptan y reproducen en los sistemas forestales. Es decir, en el tiempo, la población de hongos se incrementa de forma gradual (Reséndiz *et al*., 2020). El estatus fitosanitario del arbolado de las ciudades, también se agudiza con el cambio climático y el efecto de las enfermedades forestales provocadas por hongos fitopatógenos (Cibrián, 2016; Giraldo-Aristizábal *et al*., 2022). Con base en los antecedentes anteriores, el objetivo de esta investigación consistió en analizar la predominancia de especies forestales y determinar la presencia de hongos fitopatógenos en el arbolado de la Ciudad de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este se estableció a partir de la distribución de parques y jardines de la CDMX, con vegetación nativa e introducida, de forma aleatoria el arbolado de estudio se delimitó en el Parque 18 de marzo, entre los 19° 29′ 00″ N y 99° 07′ 24″ O. Con superficie de 66,700 m^2. El clima de acuerdo con Köppen (1936) modificado por García (2004) se clasifica como C (w_1) (w)(i)g, templado subhúmedo con lluvias en verano (700 mm a 1100 mm), temperatura anual de 5 a 18 °C y humedad relativa del 55 % (INEGI, 2018).

Muestreo población forestal

Durante el periodo comprendido entre diciembre 2018 y diciembre 2020 se realizaron 24 muestreos en intervalos de 30 d, el estudio se realizó en el total de la población del arbolado. Por especie botánica se registraron cantidad de árboles, fecha y coordenadas UTM con geoposicionador (GARMIN®) modelo Global Positioning System® (12XL). En el sitio de estudio se identificaron las especies arbóreas con la Guía de Árboles y Arbustos de la Zona Metropolitana de la CDMX (Rodríguez y Cohen, 2003). En el laboratorio de Botánica del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF) del Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, el material botánico de frutos, hojas y órganos florales se clasificó con base en el manual de Rzedowski *et al*. (2005), y con base en la especie forestal, las muestras se fraccionaron en cinco submuestras (cinco repeticiones) de cada estructura vegetal.

Incidencia de hongos fitopatógenos

En la población total del arbolado se realizó el censo y la georreferenciación de árboles enfermos empleando GPS GARMIN®. Se efectuó inspección visual para localizar signos con base en estructuras del hongo fitopatógeno y síntomas basados en pigmentaciones, clorosis, moteados, mosaicos, marchitez, quemaduras, necrosis y defoliación en el tallo y follaje tomando como referencia guías ilustradas con síntomas de plantas agrícolas y uso forestal (Díaz-Núñez *et al*., 2014; Cibrián, 2016; Aprea y Murace, 2019). Durante el reconocimiento se registró la interacción de parasitismo entre el huésped y el hospedero. Acorde con la fisiología vegetal del follaje y cambios fenológicos, por especie arbórea, las muestras se tomaron en intervalos de 30 d. Con base en los cuatro puntos cardinales el tejido leñoso, hojas y brotes axilares con signos y síntomas se tomaron por triplicado. A la par, el muestreo también se realizó dividiendo la copa del árbol en cuatro estratos considerando la parte basal de la copa como estrato uno, y la parte apical de la copa como el estrato cuatro y con el promedio del número de casos obtenidos se estimó la incidencia. Las muestras se conservaron en bolsas estériles de polietileno a 4 °C.

Análisis microbiológico

Por cada árbol que presentó sintomatología se realizaron aislamientos de los hongos fitopatógenos. El aislamiento se llevó a cabo con base en el Manual para el Aislamiento y Reproducción de Hongos Fitopatógenos de Shurtleff y Averre (1997), Waller *et al*. (1998) y Riley (2002). Los cultivos se realizaron en Cajas Petri con Agar Dextrosa Papa (PDA), Dextrosa Sabouraud (DS), Rosa de Bengala (RB) y Agar Agua (AA), las placas se incubaron a 28 ºC en obscuridad total, hasta la for-

mación de cuerpos fructíferos y estructuras de reproducción. La identificación de los especímenes fue morfométrica, con base en la observación directa de colonias y reconocimiento de estructuras de reproducción a través de microscopio estereoscopio SZX7 Olympus® y microscopio compuesto Olympus C3®. Se tomó como base las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972); Alexopoulus y Mims (1985); Márquez (2005); Cibrián-Tovar *et al*. (2008); Ainsworth (2009); Carris *et al*. (2012) y Cibrián (2016).

Comportamiento epidemiológico

El riesgo fitosanitario y la intensidad de la enfermedad en las especies nativas y exóticas se determinó con la sumatoria de la especie del arbolado afectada. La incidencia se calculó con la Dinámica Poblacional Forestal acumulada con la siguiente fórmula:

$$Incidencia = \frac{DPFa}{TPFa}\ x\ 100$$

Donde: *DPFa* = Dinámica Poblacional Forestal acumulada; *TPFa* = Total Poblacional Forestal acumulada.

La curva de Frecuencias relativas acumuladas (F*i*) se obtuvo con base en la fórmula:

$$\mathrm{F}i = \frac{Ni}{n}$$

Donde: F*i* = Frecuencia relativa acumulada; *Ni* = Frecuencia absoluta acumulada; *n* = Frecuencia absoluta.

Los datos de incidencia y frecuencia relativa (F_R) fueron procesados en una hoja de Excel y se llevaron a cabo los análisis estadísticos con el programa JMP® Versión 8. En función del tamaño de muestras, se realizó una comparación de medias ± desviación estándar (DE) con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Predominancia de especies forestales

De acuerdo con la PAOT (2018), en la CDMX, 20.4 % del suelo urbano está protegido por áreas verdes, de esta superficie el 55.9 % son zonas arboladas, la población de árboles en su mayoría está constituida por especies introducidas, estos datos coinciden con el censo forestal de esta investigación (Tablas 1 y 2). Las áreas destinadas a parques y jardines de la CDMX se encuentran en constante amenaza por el deterioro ambiental causado por invasión de áreas verdes, daños físicos, mecánicos, contaminación directa a las especies forestales, además de los efectos causados por plagas y enfermedades que son introducidas por el hombre, quien se da a la tarea de mover e introducir especies forestales sin ninguna medida fitosanitaria o de planeación espacial (SEDEMA, 2018). Derivado de las recurrentes prácticas al arbolado de la CDMX, en las alcaldías se pierden en promedio 210 ha de composición arbórea. En la alcaldía Gustavo A. Madero de 785.2 ha de áreas verdes, 344 ha son destinadas a la cubierta forestal (PAOT, 2018). En el estudio realizado al arbolado de parques y jardines del Parque 18 de Marzo de la Ciudad de México predominaron 39.51 % (337 árboles) de especies nativas Tabla 1) y 60.49 % (516 árboles) especies exóticas, con población de 853 árboles (Tabla 2). En este sentido, los datos derivados del sitio de estudio permitirán la actualización del censo forestal de especies nativas e introducidas. La diversidad de especies se concentró en 25 familias botánicas y predominaron las familias de especies introducidas (Cuadro 2). Estos datos concuerdan con lo reportado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, quien menciona que la diversidad de árboles en las áreas urbanas es exótica (CONABIO, 2016). Las especies arbóreas nativas que se identificaron en el arbolado son originarias de México, E.U.A y Guatemala. La distribución de especies exóticas identificadas en este estudio es de Asia Central, Australia, China, Corea, Japón, Islas Norfolk, India, Nepal, Pakistán, Tailandia, Malasia, Polinesia, Brasil, Argentina, Perú, Chile e Islas Canarias.

El histograma de incidencia de especies arbóreas (Figura 1) revela a Cedro Blanco (*C. lusitanica* Mill) como la especie endémica más abundante del parque con 221 árboles. Le siguen el Fresno (*F. uhdei* (Wenz.) Lingelsh), Yuca (*Y. elephantipes* Regel), Colorín o Zompantle (*E. coralloides* Miller), Ahuehuete (*T. mucronatum* Ten), Ahuejote (*S. bonplandiana* Kunth) y Capulín (*P. serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh).

La frecuencia más alta de las especies exóticas con 131 árboles pertenece a la Casuarina (*C. equisetifolia* L.), enseguida, el Olmo chino (*U. parvifolia* Jacq.), Trueno (*L. lucidum* W.T. Aiton), Eucalipto (*E. camaldulensis* Dehn), Palmera (*P. canariensis* Chabaud), Alcanfor (*E. globulus* Labill.), Pirul (*S. molle* L.), Jacaranda (*J. mimosifolia* D. Don) y Duraznero (*P. persica* (L.) Batsch) como la población de especies arbóreas introducidas más sobresalientes.

Incidencia de hongos fitopatógenos

En el sitio de estudio se observaron 10 géneros de hongos concentrados en nueve familias causantes de enfermedades, que pertenecen a las órdenes Erysiphales, Pucciniales, Pleosporales, Eurotiales, Capnodiales, Hypocreales y Mycosphaerellales. Los hongos de la familia Erysiphaceae causaron cenicilla en el haz de la hoja de *A. negundo* y *P. persica*; Uropyxidaceae produjeron Roya café-cobrizo en el envés de las hojas de *P. serotina*; Pleosporaceae mostraron mancha foliar circular en las hojas de *F. benjamina*, *S. terebinthifolius* y *L. styraciflua*, también, en *U. parvifolia* se observaron manchas foliares en el margen y centro de la hoja; Melampsoraceae manifestaron roya amarillo-naranja en el envés de las hojas de *P. alba*; Trichocomaceae ocasionó manchas foliares en margen del haz y envés de la hoja de *S. terebinthifolius* y en *C. lusitanica* originó clorosis en brácteas de las hojas; Nectriaceae causaron manchas foliares en follaje de *E. coralloides*; Mycosphaerellaceae expresaron orificios circulares definidos y manchas foliares rojizas en *P. persica*, asimismo, en *E. camaldulensis* se observó mancha foliar en haz y envés de la hoja; Hypocreomycetidae y Sphaerioidaceae causaron síntomas de cancro y muerte en ramas en *U. parvifolia* (Tabla 3).

Tabla 1. Especies arbóreas nativas del Parque 18 de Marzo de la CDMX.
Table 1. Native tree species of the Parque 18 de Marzo of CDMX.

Familia	Especie	Nombre común	Ã	*F_R (%)	**F*i* (%)
Betulaceae	*Alnus acuminata* Kunth[2]	Aile, aliso	1	0.12±0.01^{r}	0.001
Scrophulariaceae	*Buddleja cordata* Kunth[3]	Tepozán	1	0.12±0.01^{r}	0.002
Pinaceae	*Pinus cembroides* Zucc[1]	Pino, piñón	1	0.12±0.01^{r}	0.003
Sapindaceae	*Acer negundo* subsp. *mexicanum* (DC.) Wesm.[1]	Acacia	2	0.23±0.01^{pq}	0.006
Altingiaceae	*Liquidambar styraciflua* var. *mexicana* Oerst[2]	Liquidambar, Copalme, Ocozote	3	0.35±0.01^{op}	0.009
Salicaceae	*Salix bonplandiana* Kunth[2]	Ahuejote	3	0.35±0.01^{op}	0.013
Rosaceae	*Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh[2]	Capulín	6	0.70±0.1^{n}	0.020
Taxodiaceae	*Taxodium mucronatum* Ten[1]	Ahuehuete, sabino	9	1.06±1.0^{lm}	0.030
Fabaceae	*Erythrina coralloides* Miller[2]	Colorín, zompantle	14	1.64±1.0^{i}	0.047
Asparagaceae	*Yucca elephantipes* Regel[1]	Yuca, isote	17	1.99±1.0^{h}	0.067
Oleaceae	*Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh[2]	Fresno	59	6.92±1.0^{d}	0.136
Cupressaceae	*Cupressus lusitanica* Mill[1]	Cedro Blanco, Ciprés	221	25.91±1.0^{a}	0.395

Ã Árboles por especie, *Frecuencia relativa; **Frecuencia absoluta acumulada; [1]Perennifolio, [2]Caducifolio, [3]Subcaducifolio; Literales diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 2. Especies arbóreas exóticas del Parque 18 de Marzo de la CDMX.
Table 2. Exotic tree species of the Parque 18 de Marzo of CDMX.

Familia	Especie	Nombre común	Ã	*F_R (%)	**F*i* (%)
Fabaceae	*Acacia retinodes* Schltdl[1]	Acacia	1	0.12±0.01^{r}	0.396
Araucariaceae	*Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco[1]	Araucaria	1	0.12±0.01^{r}	0.397
Rutaceae	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck[1]	Naranjo	1	0.12±0.01^{r}	0.398
Moraceae	*Ficus elastica* Roxb. Ex. Hornem[1]	Hule	1	0.12±0.01^{r}	0.400
Moraceae	*Ficus benjamina* L.[1]	Laurel Benjamín	2	0.23±0.01^{pq}	0.402
Salicaceae	*Populus alba* L.[2]	Álamo plateado	2	0.23±0.01^{pq}	0.404
Anacardiaceae	*Schinus terebinthifolius* Raddi[1]	Pirul del Brasil	2	0.23±0.01^{pq}	0.407
Arecaceae	*Trachycarpus fortunei* (Hook.) H. Wendl.[1]	Palma estrella	2	0.23±0. 01^{pq}	0.409
Moraceae	*Ficus carica* L.[1]	Higuera	4	0.47±0.01^{o}	0.414
Moraceae	*Ficus microcarpa* L. f.[1]	Laurel de Indias	4	0.47±0.01^{o}	0.418
Rosaceae	*Prunus persica* (L.) Batsch[2]	Durazno	10	1.17±1.0^{l}	0.430
Bignoniaceae	*Jacaranda mimosifolia* D. Don[3]	Jacaranda	11	1.29±1.0^{k}	0.443
Anacardiaceae	*Schinus molle* L.[1]	Pirú, pirul	13	1.52±1.0^{ij}	0.458
Myrtaceae	*Eucalyptus globulus* Labill.[1]	Gigante, Eucalipto, Alcanfor	34	3.99±1.0^{fg}	0.498
Arecaceae	*Phoenix canariensis* Chabaud[1]	Palmera Palma Canaria o Fénix	35	4.10±1.0^{f}	0.539
Myrtaceae	*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh[1]	Alcanfor, Eucalipto	39	4.57±1.0^{e}	0.585
Oleaceae	*Ligustrum lucidum* W.T. Aiton[1]	Trueno	99	11.61±1.0^{c}	0.701
Ulmaceae	*Ulmus parvifolia* Jacq.[2]	Olmo chino	124	14.54±1.0^{b}	0.846
Casuarinaceae	*Casuarina equisetifolia* L.[1]	Falso pino, Casuarina	131	15.36±1.0^{b}	1.00

Ã Árboles por especie, *Frecuencia relativa; **Frecuencia absoluta acumulada; [1]Perennifolio, [2]Caducifolio, [3]Semicaducifolio. Literales diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

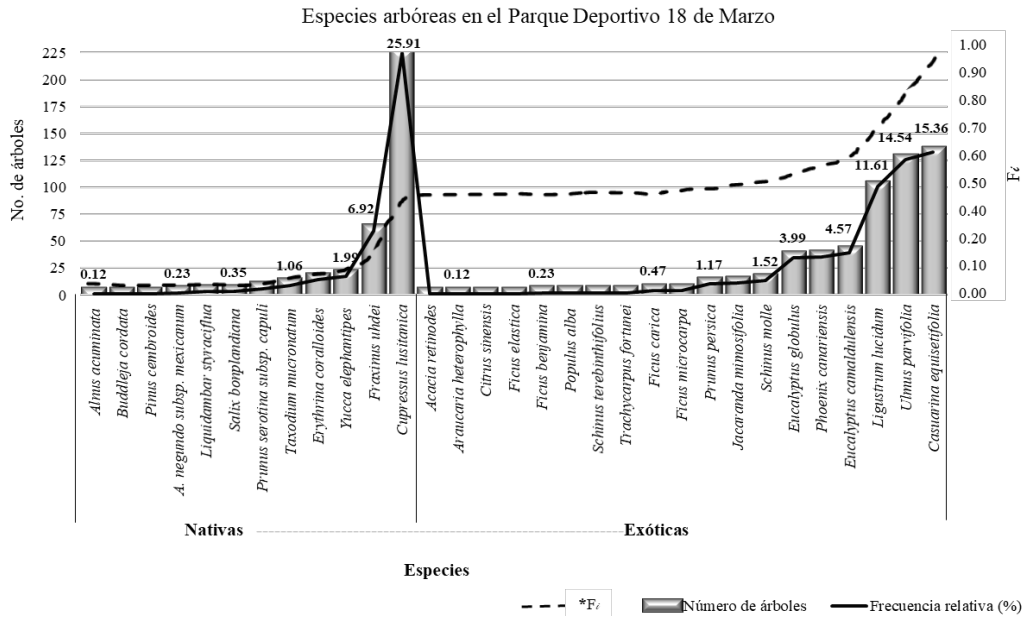


Figura 1. Histograma de incidencia de especies arbóreas del Parque 18 de Marzo de la CDMX, más la curva de *frecuencias relativas acumuladas (F*i*).
Figure 1. Histogram of incidence of tree species in the Parque 18 de Marzo of CDMX, plus the curve of *accumulated relative frequencies (F*i*).

Tabla 3. Hongos fitopatógenos presentes y frecuencia relativa en árboles del Parque 18 de Marzo de la CDMX.
Table 3. Phytopathogenic fungi present and relative frequency in trees of the Parque 18 de Marzo of CDMX.

Hospedante	**Hongos fitopatógenos**					
Especie botánica	**Familia**	**Género y especie**	**Forma de vida**	**Ã**	***F_R (%)**	****F*i (%)**
Acer negundo subsp. *mexicanum* (DC.) Wesm.	Erysiphaceae	*Oidium* sp. Vallr. ex Fr.	Po	2	0.23±0.01^{f}	0.01
Prunus serotina subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh.	Uropyxidaceae	*Tranzchelia discolor* (Fuckel) Tranzschel & MALitv.	Po	2	0.23±0.01^{f}	0.02
Ficus benjamina L.	Pleosporaceae	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.	Sf	2	0.23±0.01^{f}	0.03
Populus alba L.	Melampsoraceae	*Melampsora magnusiana* Wagner.	Po	2	0.23±0.01^{f}	0.04
Prunus persica (L.) Batsch.	Erysiphaceae	*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) de Bary.	Po	2	0.23±0.01^{f}	0.06
Schinus terebinthifolius Raddi.	Trichocomaceae	*Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem.	Sf	2	0.23±0.01^{f}	0.07
Schinus terebinthifolius Raddi.	Pleosporaceae	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.	Sf	2	0.23±0.01^{f}	0.08
Erythrina coralloides Miller.	Nectriaceae	*Fusarium* sp. Schltdl.	Pf	3	0.35±0.01^{e}	0.10
Liquidambar styraciflua var. *mexicana* Oerst.	Pleosporaceae	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.	Sf	3	0.35±0.01^{e}	0.11
Prunus persica (L.) Batsch.	Mycosphaerellaceae	*Wilsonomyces carpophilus* (Lév.) Adask., J.M.Ogawa & E.E.Butler.	Po	3	0.35±0.01^{e}	0.13
Eucalyptus camaldulensis Dehnh.	Mycosphaerellaceae	*Kirramyces epicoccoides* (Cooke & Masee) Walker. Sutton & Pascoe.	Sf	20	2.34±0.01^{d}	0.25
Cupressus lusitanica Mill.	Trichocomaceae	*Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem.	Sf	22	2.58±0.01^{c}	0.38
Ulmus parvifolia Jacq.	Hypocreomycetidae	*Tubercularia* sp. (Tode) Fr.	Po	49	5.74±0.01^{b}	0.66
Ulmus parvifolia Jacq.	Pleosporaceae	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.	Sf	58	6.80±0.01^{a}	1.00

Ã No. de árboles enfermos; *Frecuencia relativa; **Frecuencia absoluta acumulada; Po. Parásito obligado; Sf. Saprobio facultativo; Pf. Parásito facultativo. Literales diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Comportamiento epidemiológico

El porcentaje de F*i* de los hongos fitopatógenos respecto a la interacción de los hospederos mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$ y $p \leq 0.05$) (Tabla 3), las diferencias pueden ser por el comportamiento epidemiológico y parasitismo micológico.

Los valores más bajos de infestación se observaron en *A. negundo* subsp. *mexicanum*, *P. serotina* subsp. *capuli*, *F. benjamina*, *P. alba*, *P. persica*, *S. terebinthifolius*, *E. coralloides* y *L. styraciflua* var. *mexicana* en contraste, la curva de mayor crecimiento epidemiológico fue en *U. parvifolia* (Figura 2).

El arbolado con mayor incidencia acumulada por microorganismos fitopatógenos fue *U. parvifolia*, especie que presentó lesiones en forma de manchas foliares en el margen y centro de la hoja, causadas por *Alternaria alternata* de la familia Pleosporaceae del orden Pleosporales (Figura 3).

La dinámica poblacional de las enfermedades con base en la interacción de los fitopatógenos con los hospederos nativos y exóticos expresaron comportamiento heterogéneo, este comportamiento tiende a expresarse cuando las especies forestales son introducidas a un ecosistema forestal diferente al sitio de origen, es decir, cuando las especies exóticas inician el proceso de adaptación a ambientes diferentes (Giraldo-Aristizábal *et al*., 2022).

En este patosistema se observó que cuando la interacción planta-patógeno es recurrente, la carga microbiológica tiende a expresarse con mayor o menor intensidad sobre el hospedero (Kosman *et al*., 2019), estos datos también concuerdan con Reséndiz *et al*. (2020), quienes observaron que, durante el parasitismo del hongo fitopatógeno sobre la especie forestal introducida, el microorganismo tiene la capacidad de causar enfermedad con mayor o menor incidencia y/o severidad. La cresta de la incidencia acumulada por el número de casos registrados en la población forestal fue del 17.46 %, misma que se expresó en el número de árboles enfermos de las especies *E. camaldulensis*, *C. lucitanica* y *U. parvifolia*, datos similares concuerdan con Cervantes *et al*. (2019). El comportamiento epidemiológico de las enfermedades en el arbolado del sitio de estudio expresó la curva epidemiológica en forma ascendente, en una especie nativa y dos exóticas, estos datos concuerdan con Saavedra-Romero *et al*. (2016), quienes mencionan que la dinámica poblacional de las enfermedades en el arbolado de áreas urbanas tiende a ser con mayor frecuencia en las especies introducidas, especialmente cuando el ambiente es diferente al lugar de procedencia. El grado de afectación con base en el número de brotes en las especies arbóreas se vio marcada por *K. epicoccoides*, *A. niger*, *Tubercularia* sp. y *A. alternata* con 2.34, 2.58, 5.74 y 6.80 %, respectivamente, datos similares son reportados por Cibrián *et al*. (2001), en el diagnóstico fitosanitario del Olmo Chino.

A. alternata quien provocó mancha foliar en la periferia y centro de la hoja en *F. benjamina* L. también ha sido reportada por Reséndiz *et al*. (2015) asociado a clorosis de las hojas de *F. uhdei*, con frecuencias hasta del 100 %.

El micromiceto *K. epicoccoides* se detectó causando manchas foliares en haz y envés de las hojas de *E. camaldulensis*, también se observó que causa manchas irregulares de color púrpura en el haz y envés de las hojas (Agrios, 2005); la forma de las manchas es angular, de 2 - 10 mm de diámetro (Ainsworth, 2009) (Figura 3) y está delimitada por las nervaduras de las hojas. Dentro de las manchas se presentaron picnidios

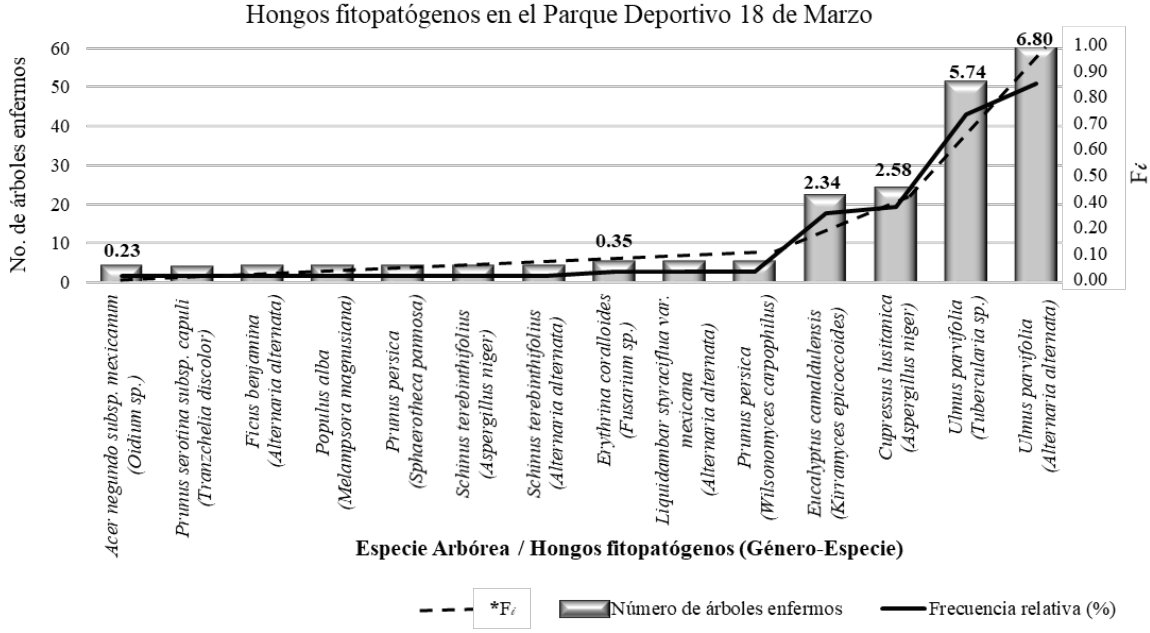


Figura 2. Histograma de incidencia de hongos fitopatógenos presentes en el arbolado del Parque 18 de Marzo de la CDMX, más la curva de *frecuencias relativas acumuladas (F*i*) obtenida de datos extraídos y analizados del total de la población arbórea acumulada.
Figure 2. Histogram of incidence of phytopathogenic fungi present in the trees of the Parque 18 de Marzo of CDMX, plus the curve of *accumulated relative frequencies (F*i*) obtained from data extracted and analyzed from the total accumulated tree population.

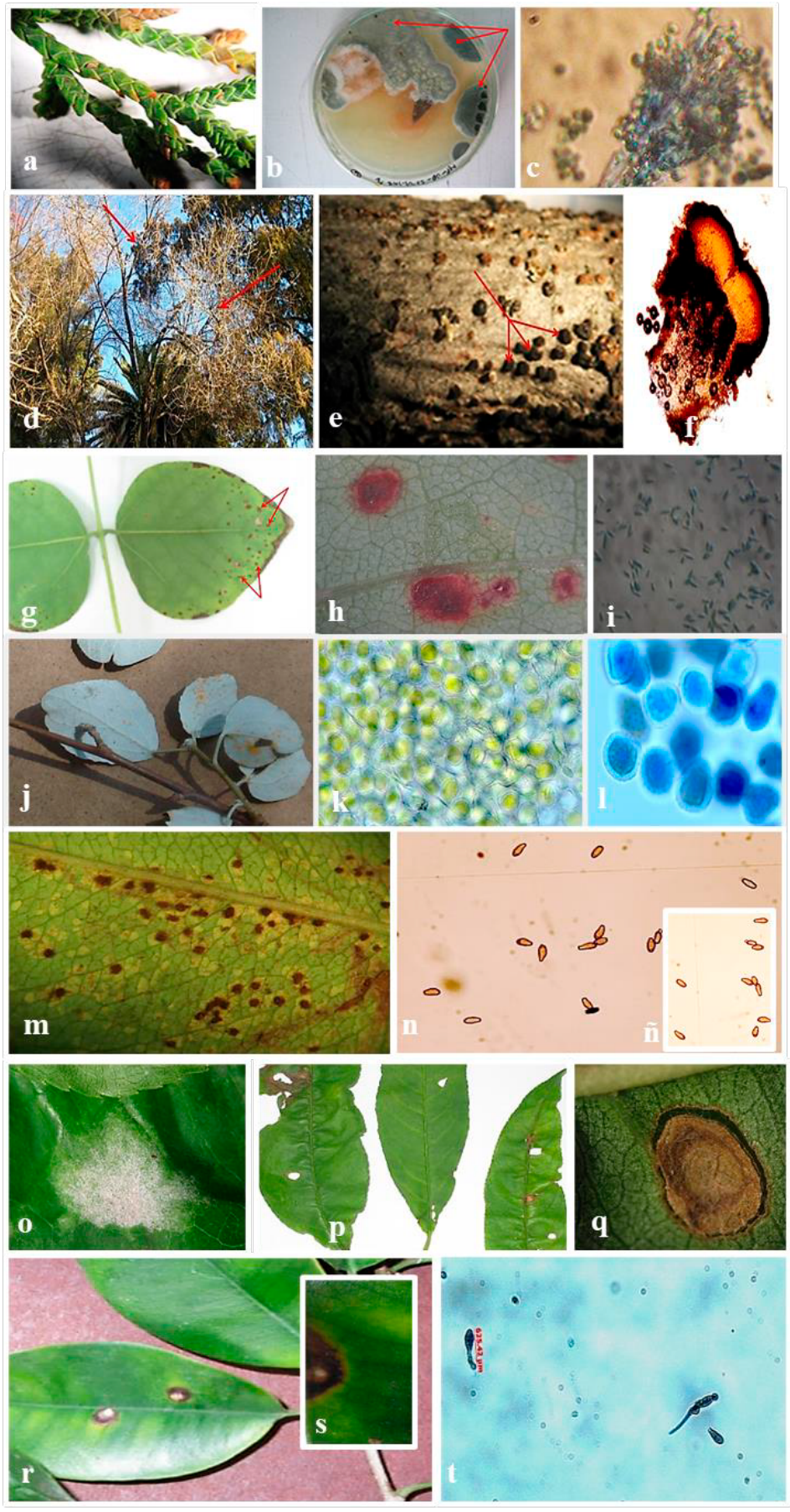


Figura 3. Signos y síntomas causados por hongos fitopatógenos en arbolado de la CDMX. a) Clorosis en bracteas de *C. lusitanica* Mill, b) Colonia de *A. niger* P.E.L. van Tieghem, c) Cuerpos fructiferos de *A. niger* P.E.L. van Tieghem; d) Cancro y muerte en ramas de *U. parvifolia* Jacq., e) Esporodoquios en Cancros de *Tubercularia* sp. (Tode) Fr., f) Esporodoquio de *Tubercularia* sp. (Tode) Fr. g) Manchas foliares en *E. coralloides* Miller, h) Acercamiento de la colonia de *Fusarium* sp. Schltdl. en hoja de *E. coralloides* Miller, i) Microconidios de *Fusarium* sp. Schltdl, j) Pústulas de Roya Naranja en *P. alba* L., k) Uredias de *M. magnusiana* Wagner, l) Equinulaciones de las uredias *M. magnusiana* Wagner; m) Roya café-cobrizo en el envés de las hojas en *P. serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh., n y ñ) Uredias de *T. discolor* (Fuckel) Tranzschel & MALitv, o) Cenicilla en hoja de *P. persica* L. causada por *S. pannosa* (Wallr.) de Bary, p y q) Tiro de Munición en *P. persica* L. causado por *W. carpophilus* (Lév.) Adask., J.M. Ogawa & E. E. Butler; r y s) Mancha Foliar Circular en *F. benjamina* L., t) Conidios de *A. alternata* (Fr.) Keissl. Causante de la Mancha Foliar Circular en *F. benjamina* L.

Figure 3. Signs and symptoms caused by phytopathogenic fungi in CDMX trees. a) Chlorosis in bracts of *C. lusitanica* Mill, b) Colony of *A. niger* P.E.L. van Tieghem, c) Fruiting bodies of *A. niger* P.E.L. van Tieghem; d) Canker and death on branches of *U. parvifolia* Jacq., e) Sporodochia on Cankers of *Tubercularia* sp. (Tode) Fr., f) Sporodochium of *Tubercularia* sp. (Tode) Fr. g) Leaf spots in *E. coralloides* Miller, h) Close-up of the colony of *Fusarium* sp. Schltdl. on leaf of *E. coralloides* Miller, i) Microconidia of *Fusarium* sp. Schltdl, j) Orange Rust pustules on *P. alba* L., k) Uredias of *M. magnusiana* Wagner, l) Echinulations of the uredias of *M. magnusiana* Wagner; m) Copper-brown rust on the underside of the leaves in *P. serotina* subsp. capuli (Cav.) McVaugh., n and ñ) Uredias of *T. discolor* (Fuckel) Tranzschel & MALitv, o) Powdery mildew on the leaf of *P. persica* L. caused by *S. pannosa* (Wallr.) de Bary, p and q) Ammunition Shot in *P. persica* L. caused by *W. carpophilus* (Lév.) Adask., J.M. Ogawa & E.E. Butler; r and s) Circular Leaf Spot in *F. benjamina* L. t) Conidia of *A. alternata* (Fr.) Keissl. Cause of Circular Leaf Spot in *F. benjamina* L.

de color negro, globosos, con dimensión de 50 - 130 µm de diámetro (Alexopoulus y Mims, 1985).

En el avance progresivo de los daños de clorosis en brácteas que expresaron los hospederos de *A. niger*, el tejido enfermo mostró estructuras de conidióforos largos, con ápice hinchado, y bajo microscopio se confirmó la cubierta de una o dos series de esterigmas, en donde se forman conidios hialinos, catenulados, globosos u ovales (Alexopoulus y Mims, 1985). El riesgo fitosanitario de este microorganismo en el arbolado de áreas urbanas es la capacidad de propagación y reproducción del hongo, es decir, las condiciones de adaptación del patógeno pueden facilitar la infestación de estructuras cercanas de los hospederos susceptibles (Cibrián-Tovar *et al*., 2008; Ainsworth, 2009).

La constante aparición de cancros y muerte de tejido del arbolado causado por *Tubercularia* sp. en *U. parvifolia* (Figura 3) es efecto que se expresa de manera periódica en árboles débiles como respuesta de factores diversos asociados al medio en el que se desarrolla la especie (Cibrián *et al*., 2001; Hernández *et al*., 2022). La formación de este tipo de lesiones, generalmente inician en la primavera, el avance de la enfermedad tiene efecto directo en el tejido de ramas nuevas y, ocasionalmente, en ramas viejas (Alexopoulus y Mims, 1985). La forma del cancro se observó indefinida, oval, incluso prolongada, en ocasiones adoptó patrones con bandas longitudinales (Ainsworth, 2009). De acuerdo con Cibrián (2016) la formación de callos en el margen de las lesiones es usual, con el tiempo la corteza se agrieta, fragmenta y el tejido celular muere. También fue común encontrar de forma dispersa estructuras vegetativas muertas y en algunos casos se desprende del hospedero. Los daños causados por estos hongos con regularidad afectan la calidad y salud del arbolado, y esto ocasiona alteraciones al ambiente, al contribuir de forma recurrente la pérdida de cobertera forestal de la CDMX (PAOT, 2018). La recurrencia de daños en el arbolado fueron manchas foliares en haz y envés de la hoja, clorosis en brácteas, cancros y muerte de ramas, manchas foliares en el margen y centro de las hojas, manchas circulares en las hojas, perforaciones circulares con manchas de color rojo, además de la presencia de cenicillas en el haz de la hoja, roya café-cobrizo, roya amarilla y naranja en el envés de las hojas. La descripción de lesiones que se presentan en el arbolado del Parque 18 de Marzo son una muestra de lo que se manifiesta en los árboles de la CDMX y que puede facilitar el manejo oportuno de las enfermedades a través del reconocimiento de las lesiones causadas por hongos. En este sentido, los efectos patológicos estudiados en las estructuras de los árboles de las áreas urbanas también son mencionados por Cibrián-Tovar *et al*. (2008) y Cervantes *et al*. (2019). La dinámica poblacional de las enfermedades que infestaron la diversidad de especies del arbolado del Parque 18 de Marzo de la CDMX asemejan el comportamiento epidemiológico de las enfermedades reportadas por Cervantes *et al*. (2019) en el arbolado de la Tercera Sección del Bosque de Chapultepec y lo reportado por Reséndiz-Martínez *et al*. (2019) en el Parque Tezozómoc de la CDMX. Finalmente, la expresión de signos y síntomas causados por hongos fitopatógenos, asociados en el arbolado del sitio de estudio refleja el comportamiento epidemiológico general, presente en las especies nativas e introducidas en parques y jardines de la CDMX, estos datos contribuyen en el conocimiento sobre el estatus que resguardan los bosques de la CDMX, y con ello promover el manejo preventivo de movilización e introducción de especies forestales, como medida precautoria en la que se desconoce la sanidad del material vegetativo.

CONCLUSIONES

En el arbolado de parques y jardines de la Ciudad de México, la biodiversidad de especies forestales es diversa, la población del arbolado nativo que predominó en el Deportivo 18 de Marzo fueron Cedro Blanco (*C. lusitanica* Mill), Fresno (*F. uhdei* (Wenz.) Lingelsh), Yuca (*Y. elephantipes* Regel), Colorín o Zompantle (*E. coralloides* Miller), Ahuehuete (*T. mucronatum* Ten), Ahuejote (*S. bonplandiana* Kunth) y Capulín (*P. serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh). Las especies arbóreas introducidas que predominaron y que expresaron frecuencia más alta fueron Casuarina (*C. equisetifolia* L.), Olmo Chino (*U. parvifolia* Jacq.), Trueno (*L. lucidum* W.T. Aiton), Eucalipto (*E. camaldulensis* Dehn), Palmera (*P. canariensis* Chabaud), Alcanfor (*E. globulus* Labill.), Pirul (*S. molle* L.), Jacaranda (*J. mimosifolia* D. Don) y Duraznero (*P. persica* (L.) Batsch). La frecuencia de daños en el arbolado fue causada por los hongos fitopatógenos *A. alternata*, *Tubercularia* sp., *Aspergillus niger*, *Kirramyces epicoccoides*, *Wilsonomyces carpophilus*, *Fusarium* sp., *Sphaerotheca pannosa*, *Melampsora magnusiana*, *Tranzchelia discolor* y *Oidium* sp. Los síntomas que prevalecieron en haz y envés de las hojas fueron manchas foliares en el margen y centro, clorosis, perforaciones circulares con bordes de color rojo, royas amarilla y naranja en el envés, cenicillas y royas café-cobrizo en el haz de las hojas, cancros y muerte del tejido meristemático en ramas y tejido leñoso. El pico de incidencia acumulada por número de casos registrados con enfermedades causadas por hongos en la población arbórea fue del 17.46 %, con base en número de árboles enfermos. *A. alternata* causó la dinámica poblacional de mayor impacto en el arbolado del Parque 18 de Marzo de la CDMX. La expresión e incidencia de signos y síntomas causados por hongos fitopatógenos, en el arbolado reflejó el comportamiento epidemiológico general, presente en las especies nativas e introducidas en parques y jardines de la CDMX. La identificación de hongos fitopatógenos e incidencia en las especies arbóreas expresó el estatus fitosanitario, que permitirá proponer medidas de manejo integrado de enfermedades en parques y jardines de la CDMX.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

Agrios, G.N. 2005. Plant patology. 5th Edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 64-116 Pp. https://www.elsevier.com/books/plant-pathology/agrios/978-0-08-047378-9 http://biblioteca.utsem-morelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA%20-%20George%20N-Agrios.pdf (20 de enero de 2021).

Ainsworth, G.C. 2009. Introduction to the history of micology. Cambridge University Press, London, England. 376p. https://books.google.com.mx/books?printsec=frontcover&vid=LCCN75021036&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Alexopoulus, C.J. y Mims, C.W. 1985. Introducción a la micología. Omega. Barcelona, España. 330p. https://www.academia.edu/34371426/Introducción_A_La_Micolog%C3%ADa_C_Alexopoulos_C_Mims_Omega_1985_pdf

Aprea, A.M. y Murace, M.A. 2019. Problemáticas sanitarias del arbolado. Editorial de la Univer-sidad Nacional de La Plata (EDULP). Argentina. 156p. https://doi.org/10.35537/10915/82977

Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Moser, W.K., Nowakowska, J.A., Oszako, T., Benia, F. y Belbahri, L. 2021. The threat of pests and pathogens and the potential for biological control in forest ecosystems. Forests. 12: 1579. https://doi.org/10.3390/f12111579

Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 4a Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, U.S.A. 234p. file:///C:/Users/mgrac/Downloads/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fo.pdf

Carris, L.M., Little, C.R. y Stiles, C.M. 2012. Introduction to fungi. The Plant Health Instructor. https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroFungi.aspx.

Cervantes B.M., Ortiz, R.B. y Reséndiz, M.J.F. 2019. Condición fitosanitaria del arbolado de la Tercera Sección del Bosque de Chapultepec. Revista Mexicana de Agroecosistemas. 6(1): 122-135. https://www.voaxaca.tecnm.mx/revista/docs/RMAE%20vol%206_1_2019/12%20RMAE_2019-10-Arbolado.pdf

Cibrián, T.D. Sánchez-Sámano, J. y Zamudio-Valencia, A. 2001. Diagnóstico fitosanitario del Olmo Chino (*Ulmus parvifolia* JACQ.) en la Delegación Iztacalco de la Ciudad de México. Revista Chapingo Serie Ciencias y del Ambiente. 7(2): 133-138. https://docplayer.es/29512700-Diagnostico-fitosanitario-del-olmo-chino-ulmus-parvifolia-jacq-en-la-delegacion-iztacalco-de-la-ciudad-de-mexico.html

Cibrián-Tovar, D., García, S.D. y Don Juan, B.M. 2008. Manual identificación y manejo de plagas y enfermedades en viveros forestales. CONAFOR. Ciudad de México, México. 12-122 Pp. http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/MANUALES%20PROD%20PLANTA%20SANIDAD.pdf (08 de marzo 2021).

Cibrián, T.D. 2016. Manual para la identificación y manejo de plagas en plantaciones forestales comerciales. Comisión Nacional Forestal. SEMARNAT. Estado de México, México. 238 p. http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Manuales-Tecnicos/Manual_para_la_identificacion_y_manejo_de_plagas_en_plantaciones_forestales.pdf

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2007. Manual de sanidad forestal SEMARNAT. Zapopan, Jalisco, México. 76p. http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/15/810Manual%20de%20sanidad%20forestal.pdf

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2023. Principales indicadores forestales. SEMARNAT, México. https://snmf.cnf.gob.mx/principaleindicadoresforestalesciclo-2015-2020/

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2016. La biodiversidad en la Ciudad de México. CONABIO/SEDEMA. Ciudad de México, México. 350p. https://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium-bin/detalle.pl?Id=20210831105109

Díaz-Núñez, V., Sosa-Ramírez, J. y Macías-Medina, I.P. 2014. Diagnóstico fitosanitario de la vegetación en ecosistemas prioritarios de Aguascalientes, Comisión Nacional Forestal-Secretaria de Medio Ambiente del estado de Aguascalientes. Aguascalientes, México, México. 84 p. https://docplayer.es/24342604-Diagnostico-fitosanitario-de-la-vegetacion-enecosistemas-prioritarios-del-estado-de-aguascalientes.html

García, A.E. 2004. Modificaciones al sistema climático de Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 97 p. http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1

Giraldo-Aristizábal, C.I., Mera-Velasco, Y.A., Rivas-Zúñiga, S.C., Muñoz-Lara, D.G., Acosta-Hílamo, L.M., Pérez-Muñoz, M., Villalba-Malaver, J.C. y Ordóñez-Hoyos, A.E. 2022. Evaluación fitosanitaria de *Juglans neotropica* y *Quercus humboldtii* en arbolado urbano de Popayán-Cauca, Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 46(178): 169-181. https://doi.org/10.18257/raccefyn.1542

Hernández, G.L., Hernández, M.F.R. y Dago, D.Y. 2022. Organismos nocivos en el arbolado urbano en la ciudad de Pinar del Río, Cuba. Revista Cubana de Ciencias Forestales. 10(2): 230-243. http://cfores.upr.edu.cu/index.php/podium/article/view/753 http://scielo.sld.cu/pdf/cfp/v10n2/2310-3469-cfp-10-02-230.pdf

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2018. Anuario estadístico y geográfico de la Ciudad de México. INEGI. Ciudad de México, México. https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=09 (24 de abril de 2021).

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2021. Conjunto de datos vectoriales de uso del suelo y vegetación. Escala 1:250 000. Serie VII. Conjunto Nacional. Consultado [28 de abril de 2023]. https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=889463842781

Kosman, E., Chen, X., Dreiseitl, A., McCallum, B., Lebeda, A., Ben-Yehuda, P., Gultyaeva, E. y Manisterski, J. 2019. Functional Variation of Plant–Pathogen Interactions: New Concept and Methods for Virulence Data Analyses. Phytopathology. 109: 1324-1330. https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0041-LE

Márquez, L.J. 2005. Técnicas de Colecta y Preservación de Insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 37: 385-408. https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/7510?show=full

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2018. El estado de los bosques del mundo-Las vías forestales hacia el desarrollo sostenible. Roma, Italia. 153 p. http://www.fao.org/state-of-forests/2018/es/

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT). 2021. Bosques. Tierras Forestales. Roma, Italia. http://www.fao.org/faostat/es/#data/GF

Procuraduría Ambiental y del Ordenamiento Territorial de la Ciudad de México (PAOT). 2018. Las áreas verdes de la Ciudad de México. Gobierno de la CDMX. México. 108p. http://centro.paot.org.mx/documentos/paot/libro/3PAOT_AreasVerdes_2018.pdf

Reséndiz, M.J.F., Guzmán, L.D., Muñoz, A.L.V., Nieto, C.P.P. y Olvera, L.P.C. 2015. Enfermedades foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D. F. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 6(30): 106-123. https://www.redalyc.org/pdf/634/63442410009.pdf

Reséndiz-Martínez, J. F., Guzmán, L.D., Muñoz, A.L.V., Olvera, L.P.C., Pacheco, H. Ma. y Arriola, V.J.P. 2019. Phytophagous mites and insects in the Recreational and Cultural Tezozomoc park trees, Azcapotzalco, Mexico City. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 10(56): 149-173. doi: https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.454

Reséndiz, M.J.F., García, L.I.D., Ramón, M.M., Gutiérrez, R.M. y Ruiz, J.D. 2020. Salud forestal del arbolado de la segunda sección del bosque de Chapultepec de la Ciudad de México. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, 19(36): 137-164. https://publicaciones.xoc.uam.mx/MuestraPDF.php

Riley, M.B., Williamson, M.R. y Maloy, O.C. 2002. Plant disease diagnosis. Spanish translation by José Carlos Ureta R., 2016. The Plant Health Instructor. 10.1094/PHI-I-2002-1021-01 https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/casestudies/Pages/DiagnosticoEnfermedadesPlantas.aspx

Rodríguez, S.L. y Cohen, E.J.F. 2003. Guía de árboles y arbustos de la zona metropolitana de la Ciudad de México. Gobierno del Distrito Federal. Secretaría del Medio Ambiente. Ciudad de México. México. 210-383Pp. file:///C:/Users/Daniel/Downloads/GuaderbolesyarbustosdelazonametropolitanadelaCDMXL.RodrguezE.Cohen.pdf .

Rzedowski, G.C. de y Rzedowski, J.R. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), México. 44-1406Pp. https://www.academia.edu/41097296/Flora_fanerog%C3%A1mica_de_M%C3%A9xico

https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf

Saavedra-Romero, L. de L., Alvarado-Rosales, D., Hernández-de la Rosa, P., Martínez Trinidad, T., Mora-Aguilera, G. y Villa-Castillo, J. 2016. Condición de copa, indicador de salud en árboles urbanos del Bosque San Juan de Aragón, Ciudad de México. Maderas y Bosques. 22(2): 15-27. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61749306012

Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA). 2018. Inventario de áreas verdes. Gobierno de la Ciudad de México. México. [Consultado 20 diciembre 2023] https://www.sedema.cdmx.gob.mx/programas/programa/inventario-de-areas-verdes

Sosa, D.L., Méndez, J.G., García, M.A.A., Cambrón, C.S.S., Villarreal, J.Á.Q., Ruiz, C.G.G. y Montoya, J.C.J. 2018. Potential distribution of borers, defoliators, barking beetles and mistletoes in coniferous forests of Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 9(47): 187-208. https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i47.159

Shurtleff, M.C. y Averre, C.W. 1997. The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. https://my.apsnet.org/APSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A-8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=42171

Waller, J.M., Ritchie, B.J. y Holderness, M.D. 1998. Plant Clinic Handbook. CAB International, New York, NY, USA. 15-94Pp. https://sfu-primo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/fulldisplay/01SFUL_ALMA21162753280003611/SFUL

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Original Article

Sustainable biogas production via anaerobic co-digestion of cheese whey and cattle manure

Producción sostenible de biogás mediante co-digestión anaerobia de lactosuero y estiércol bovino

Marco Arturo Velasco Morales[1], José Apolonio Venegas-Venegas[2*], Mariela Beatriz Reyes Sosa[2], Raúl Hernández-Altemirano[3*], Violeta Y. Mena-Cervantes[3], Rene Pinto Ruíz[1], Pascual López de Paz[4], Carlos Alonso Meza Avendaño[4], Fidel Alejandro Aguilar-Aguilar[3*]

[1] Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad-Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), Carretera Ocozocoautla Villaflores, Chiapas #230, CP 30470., México.
[2] Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera Ocozocoautla Villaflores, Chiapas # 230, CP 30470., México.
[3] Centro Mexicano para la Producción más Limpia y Laboratorio Nacional de Desarrollo y Aseguramiento de la Calidad de Biocombustibles (LaNDACBio) del Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticomán, 07340, Ciudad de México, México.
[4] Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento norte poniente 1150 Lajas Maciel, 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

ABSTRACT

In Mexico, specifically in Chiapas, the dairy cattle industry plays a significant role in cheese and milk production. However, the large quantities of cattle manure (CM) and cheese whey (CW) generated as byproducts pose environmental challenges if not managed properly. To address this issue, anaerobic digestion (AD) technology offers a sustainable solution for organic waste treatment, and biogas production. This research study focuses on assessing the potential of CW and CM, both individually and in co-digestion, in an anaerobic environment, as a potential treatment for such wastes. The study also evaluated biogas yield and composition using an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor with different CW and CM mixtures. The findings indicate that the 30CM:70CW ratio exhibited the highest methane yield, surpassing other assays in co-digestion and mono-digestion. Furthermore, the UASB reactor showed that a 90CW:10CM mixture produced 25.73 L of biogas per gram of volatile solids (VS) daily, comprising 60 % methane (CH_4) and 40 % carbon dioxide (CO_2). This research demonstrates the potential for efficient and environmentally friendly treatment of CM and CW through optimized co-digestion and UASB technology, highlighting the opportunity to generate biogas while reducing waste.

Keywords: Biogas, anaerobic digestion, biochemical methane potential, substrates, methane yield

RESUMEN

En México, específicamente en el estado de Chiapas, la industria del ganado lechero juega un papel importante en la producción de queso y leche. Sin embargo, las grandes cantidades de estiércol de ganado (EB) y Lactosuero (LS) generados como subproductos generan desafíos ambientales si no se gestionan adecuadamente. Para abordar este problema, la tecnología de digestión anaerobia (DA) ofrece una solución sostenible mediante el tratamiento de residuos orgánicos y la producción de biogás. Este estudio se centra en evaluar el potencial de EB y LS, tanto individualmente como en co-digestión, en un entorno anaerobio, para el manejo de tales residuos. El estudio también evalúa el rendimiento y la composición del biogás utilizando un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) con diferentes mezclas EB y LS. Los resultados indican que la relación 30EB:70LS exhibió el mayor rendimiento de metano (CH_4), superando a otros ensayos realizados tanto en codigestión como en monodigestión. Además, el reactor RAFA mostró que una mezcla de 90EB:10LS produjo 25,73 L de biogás por gramo de sólidos volátiles por día, con una composición de 60 % de metano (CH_4) y 40 % de dióxido de carbono (CO_2). Esta investigación demuestra el potencial para el tratamiento eficiente y respetuoso con el medio ambiente de EB y LS a través de la codigestión optimizada y la tecnología RAFA, destacando la oportunidad de generar biogás mientras se reducen los desechos.

Palabras clave: Biogás, digestión anaeróbica, potencial bioquímico de metano, sustratos, rendimiento de metano.

INTRODUCTION

Anaerobic digestion (AD) is a biotechnological process involving a series of metabolic reactions in the absence of oxygen. It effectively converts organic matter, including food waste, industrial and sewage effluents, and animal organic waste (Molino *et al*., 2013; Piñas *et al*., 2016; Mainardis *et al*., 2017). AD is a highly effective technology for renewable energy (biogas) generation, while simultaneously reducing greenhouse gas emissions (GHGs) according to previous studies (Mainardis *et al*., 2017, Ohimail and Izah, 2017). Biogas is predominantly composed of CH_4 ranging from 45 % to 70 %, CO_2 ranging from 30 % to 45 %, and impurities (Molino *et al*., 2013; Venegas *et al*., 2017). Before implementing large-scale biodigesters for controlled biogas production, it is crucial to assess the CH_4 yield and biodegradability of substrates at the

*Author for correspondence: José Apolonio Venegas-Venegas; Raúl Hernández- Altamirano; Fidel Alejandro Aguilar-Aguilar
e-mail: falexaguilar@gmail.com; polo_tex1@hotmail.com; rhaltamirano@gmail.com
Received: June 12, 2023
Accepted: September 5, 2024
Published: November 7, 2024

laboratory scale (Labatut *et al*., 2011; Da Silva *et al*., 2018), emphasizing that laboratory-scale AD tests conducted in batch reactors provide valuable insights into substrate biodegradability. Biochemical Methane Potential (BMP) tests are specifically designed to determine the methane yield and biodegradability of individual substrates or substrate mixtures. Furthermore, anaerobic co-digestion has emerged as an alternative for the utilization of multiple organic wastes. In a previous study, it was reported that combining two or more substrates in co-digestion satisfies the nutritional requirements of the microbial community and enhances stability during the organic matter decomposition process, compared to conventional AD (Náthia-Neves *et al*., 2018).

CW represents a significant organic by-product in the agro-industry, which has been reported to originates from cheese production and contain a high concentration of organic matter, constituting 55 % of the total nutrients found in milk (Mazorra-Manzano and Moreno-Hernández, 2019). Specifically, CW is composed of approximately 96 % lactose (ranging from 46 g L^{-1} to 52 g L^{-1}), 25 % protein (ranging from 6 g L^{-1} to 10 g L^{-1}), and 8 % lipids (5 g L^{-1}). Small and medium-sized companies in the dairy industry face challenges in valorizing CW. It has been reported that in Mexico, 30 % of CW is primarily utilized as animal feed or for the production of ricotta cheese or cottage cheese (Sebastián-Nicolás *et al*., 2020). Cheese production is considered a vital economic activity in La Frailesca, Chiapas, with an estimated daily CW production of 106 m^3. However, in the region, approximately 56 % of CW is discarded, leading to its improper disposal in rivers, streams, lagoons, or directly into sewers (Esnoval *et al*., 2017). According to official data from SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera), the Frailesca region produced 72.44 million L of milk in 2021. Approximately 60 % of milk production in Chiapas is used for cheese production, indicating that 43.46 million liters were dedicated to this purpose (Esnoval *et al*., 2017). It is stated that for every kg of cheese produced, 8 to 9 L of CW are generated (Mazorra-Manzano and Moreno-Hernández, 2019). It is estimated that 39.12 million L of CW were produced, of which 19.56 million L were discarded without any treatment. Furthermore, cattle production plays a crucial role in the global supply of meat and milk, and has experienced an exponential growth in recent years. It is projected that cattle consumption will reach 76 Mt (megatonnes) over the next decade, contributing to 16 % of the total increase in meat consumption compared to the base period of 2020 (OECD, 2023).

According to SIAP (2021), cattle production in Chiapas reached 2,627,827 heads in 2021, with a predominance of 12.5 % in the Frailesca region. However, this livestock activity generates significant amounts of CM. It has been estimated that an adult cow excretes 15 kg of manure per day, resulting in a daily manure total of 4,927,175 t. Unfortunately, there is no treatment in place for CM, leading to infections, water contamination, and environmental pollution in surrounding areas (Vera-Romero *et al*., 2017). CM consists of 45 % readily biodegradable organic matter, including carbohydrates, proteins, and lipids, which can be utilized for biogas production. However, CW has a high fibrous material content (> 30 %), making it difficult to biodegrade resulting in low biogas production potential (Fagbohungbe *et al*., 2019). Neshat *et al.* (2017) proposed the use of complementary substrates, rich in readily biodegradable components in combination with CM, to compensate for the carbohydrate deficiency, enhance anaerobic process stability, improve treatment efficiency, and increase biogas yield. When it comes to the implementation of anaerobic digestion (AD), there is a wide range of reactor options available, such as the up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. UASB reactors offer advantages such as the ability to handle higher organic loads, achieve greater organic matter reduction, and generate less sludge compared to conventional reactors (Hublin *et al*., 2014; Neshat *et al*., 2017; Magdalena *et al*., 2020). The use of biofilms within UASB-type reactors has gained considerable attention as they facilitate the attachment of bacterial consortia, increase organic matter consumption, and improve biogas production (Chatterjee *et al*., 2018).

This study aimed to evaluate the potential of CW and CM for bioenergy production through anaerobic co-digestion. Specifically, the research aimed to determine the maximum amount of biogas and CH_4 that can be obtained from various CW and CM mixtures, and assess the performance of the anaerobic digestion process. The study also highlighted the advantages of anaerobic co-digestion in enhancing biogas production and its potential role in promoting sustainable energy solutions. This study hypothesized that the anaerobic co-digestion of CW and CM results in a higher yield of biogas and methane, compared to the mono-digestion of each substrate individually. Furthermore, it was expected that biomethane derived from this process exhibits qualities that make it a competitive alternative to conventional fuels, with the additional benefit of being a more durable and reliable energy source.

MATERIALS AND METHODS

Organic residues and inoculum

The CW and CM residues used in this study were sourced from "La Quesería", a dairy processing unit located in the Frailesca region, in the municipality of Villaflores, Chiapas, at 16º 35' 45" North Latitude and 93º 31' 49" West longitude. The CW was obtained from the by-product of quesillo manufacturing, while the CM was collected from adult cows in the milking area. Both residues were stored in an industrial freezer at -15 °C at the Facultad de Ciencias Agronómicas plant physiology laboratory, Universidad Autónoma de Chiapas.

The inoculum used in the BMP assays and the UASB reactor in this study, was obtained from a functioning anaerobic tubular biodigester. Before the start of the experiment, the inoculum, which contains the bacteria responsible for methane production, was stored in a hermetically sealed anaerobic reactor, ensuring the absence of oxygen, to maintain the activity of the microorganisms responsible for the degradation of organic matter. Additionally, a daily feed of

2 g of reactive-grade glucose ($C_6H_{12}O_6$) was provided to keep the inoculum active until its use in the assays and the UASB reactor.

Batch Reactor Set-up

The main objective of the BMP assays, was to determine the maximum amount of biogas that could be obtained through anaerobic co-digestion while optimizing its performance. For these assays, two key variables were used: the concentration of CM (X1) and the concentration of CW (X2) (Table 1). An experimental design based on mixtures was implemented, resulting in a total of eight assays. Assays 1 to 5 focused on anaerobic co-digestion, where the concentrations of CM and CW were varied. Subsequently, assays 6 and 7 evaluated the anaerobic digestion of each substrate individually (Table 1). Finally, assay number 8 was established as a control, using only inoculum. All experimental assays were conducted in triplicate, to reduce experimental errors and increase the reliability of the obtained results. Therefore, in this study, a total of 24 experiments were performed to evaluate the BMP of the waste mixtures (CM/CW). This rigorous approach to replication ensured the robustness of the collected data and the precision of the conclusions derived from this study.

The experimental assays were conducted using 100 mL glass bottles equipped with rubber stoppers and aluminum seals to maintain optimal anaerobic conditions. The selection of these bottles was based on their ability to maintain the desired experimental conditions, and allow for the adaptation of an outlet port for the quantification and collection of biogas. In each of the 24 reactors, an inoculum of 45.69 mL, equivalent to 5 g of VS, was added along with the respective substrates in the proportions described in Table 1. Additionally, a solution of micro and macro nutrients were added to each reactor to ensure the availability of essential nutrients for the microbial consortia. The macronutrients added included NH_4Cl (1112.0 mg L^{-1}), $(NH_4)H_2PO_4$ (132.5 mg L^{-1}), $(NH_4)_2HPO_4$ (44.50 mg L^{-1}), $MgCl_2{\cdot}6H_2O$ (250.00 mg L^{-1}), $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ (189.00 mg L^{-1}), and $NaHCO_3$ (2500.00 mg L^{-1}. The micronutrients included $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ (5.00 mg L^{-1}), $ZnCl_2$ (0.13 mg L^{-1}), $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ (1.25 mg L^{-1}), $(NH_4)6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ (1.60 mg L^{-1}), $AlCl_3{\cdot}6H_2O$ (0.13 mg L^{-1}), $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ (5.00 mg L^{-1}), $NiCl_2{\cdot}6H_2O$ (13.00 mg L^{-1}), H_3BO_3 (3.00 mg L^{-1}), $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ (8.00 mg L^{-1}), and HCl (1.00 mg L^{-1}) (Aguilar-Aguilar *et al*., 2027). To establish a completely anaerobic environment, the batch reactors for each experimental assay were purged of any excess air, as methanogenic bacteria thrive without oxygen. This was achieved by using a 60 mL syringe to remove air from the headspace of the reactors. Subsequently, the reactors were maintained at a constant temperature of 30 ± 3 °C using a Memmert brand oven, model D91126, for an incubation period of 50 d or until biogas production ceased. Before the commencement of the assays, the initial pH of the reactors was adjusted to 7.5 using a 2 N Na_2CO_3 buffer solution. This step ensured the maintenance of an optimal pH range between 6.5 and 7.5 for the anaerobic digestion process.

Biogas Measurement

The gas volume gauging system was adapted from the work of Aguilar-Aguilar *et al*. (2017) and was composed of a 500 mL inverted glass vial containing a 3 mol L^{-1} NaOH solution, whose function was to capture CO_2. The vial was adapted with a cover with an opening for the entrance of the gas produced in the anaerobic reactor, and another opening for the exit of the liquid displaced by the gas (Figure 1). Measurements were performed every 24 h after the first day of incubation by the liquid displacement method, in which the liquid displaced by the gas (Figure 1) was collected in a graduated cylinder, and the volume was then converted to the standard biogas volume (NmL) under normal conditions of pressure and temperature (1 atm, 0 °C), according to the Ideal Gas Law.

Table 1. Experimental design for the evaluation of the biochemical methane potential of cattle manure (CM) and cheese whey (CW).
Tabla 1. Diseño de experimento para la evaluación del potencial bioquímico de metano del estiércol de ganado EB y lactosuero LS.

Assays	X1: CM (%)	X2: CW (%)	Nomenclature	Raw matter (mL)	*VS (initial) (g L^{-1})
1	80	20	CoAD 80CM:20CW	6.47	11.50±0.17
2	70	30	CoAD 70CM:30CW	7.55	11.50±0.62
3	50	50	CoAD 50CM:50CW	9.72	10.87±0.14
4	30	70	CoAD 30CM:70CW	11.88	12.60±0.65
5	20	80	CoAD 20CM:80CW	12.96	14.30±0.20
6	100	0	MoAD CM	4.30	10.70±0.28
7	0	100	MoAD CW	15.13	14.40±0.00
8	-	-	MoAD Inoculum	45.69	5.63±0.15

VS=Volatile solids.
VS= Solidos volátiles.

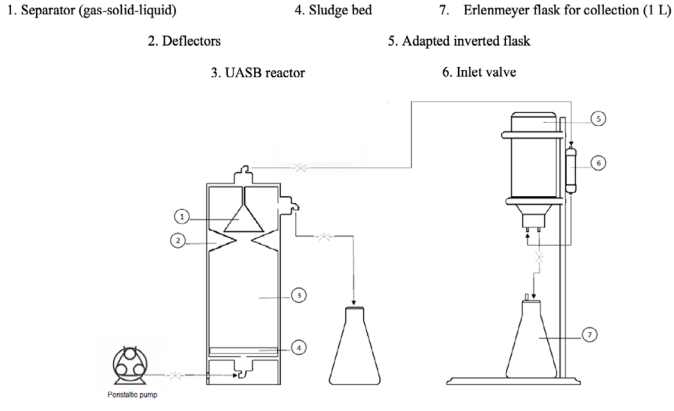


Figure 1. Diagram of biogas production and quantification in an anaerobic UASB reactor.
Figura 1. Diagrama de producción y cuantificación de biogás en un reactor anaerobio UASB.

Start-up of Up-flow Anaerobic Sludge Blanket

The reactor used in the study was a custom-designed five-liter capacity unit. It was built using 6" PVC pipe and end caps made of the same material (PVC). The reactor included 1" plastic B3 flanges at the inlet and outlet ports, as well as 1/2" stopcocks and 1/2" elbows for fluid control. Flexible silicone hose, 8 mm x 100 latex rubber hose, 3-way valves, and 4 mm silicone hose were also incorporated into the design (Figure 1). To facilitate the anaerobic digestion process, ceramic cylinders were added to create a fixed sludge bed within the reactor. These cylinders provided a surface area for the attachment and concentration of microbial biomass. Feeding of the reactor was carried out discontinuously using a Cole-Parmer masterflex® L/S® peristaltic pump. The feeding schedule involved three times per week, specifically on Mondays, Wednesdays, and Fridays. This feeding regimen was applied to each mixture in the co-digestion and mono-digestion assays involving the CW. Throughout the evaluation period, which lasted five months, the ambient temperature surrounding the reactor was monitored. This temperature recording was performed using a Fluke 28 II digital multimeter, providing valuable information regarding the temperature conditions during the experiment. Figure 1 describes the production, quantification, and characterization of the biogas produced from the experimental tests with the CM and CW mixture.

To optimize the CW concentration in the anaerobic co-digestion process, the results from the BMP tests were taken into consideration. Based on these results, the CW concentration was adjusted and evaluated in a UASB reactor as shown in Figure 1. To ensure an anaerobic condition, the reactor was fed using a masterflex® L/S® Cole-Parmer peristaltic pump. The inlet flow rate was adjusted according to the Hydraulic Retention Time (HRT), which was calculated to maintain the stability of the AD process throughout the evaluation period of the treatments. The treatments were evaluated for 15 days in each phase. Feedings were carried out every Monday, Wednesday, and Friday by adding 100 mL of the respective treatment according to Table 2. At the start-up of the reactor, 450 mL of inoculum were added using a peristaltic pump for 10 days to allow for adaptation. After the adaptation phase, the evaluation of biogas production commenced by adding only undiluted CW for a 15 days feeding period in the first phase**.** In the second phase (Table 2), the 95CM:05CW treatment was added while maintaining the volume of 100 mL of a substrate. In the third phase, the 90CM:10CW treatment was added with the same volume, and in the fourth phase, the 85CM:15CW treatment was added with 100 mL of substrate, as indicated in Table 2.

Table 2. Physicochemical characterization and dilutions of the treatments evaluated in the UASB reactor.
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica y diluciones de los tratamientos evaluados en el reactor UASB.

Treatment	Cheese whey (%)	Cattle manure (%)	COD (g L^{-1})	pH	Nomenclature
1	100	-	59.0±0.70	3.8	MoAD CW
2	95	5	59.9±0.84	3.9	CoAD CW95:05CM
3	90	10	63.2±1.76	3.9	CoAD CW90:10CM
4	85	15	65.0±1.41	4	CoAD CW85:15CM

COD= Chemical Oxygen Demand.
DQD= Demanda química de oxígeno.

Analytical Methods

Before conducting the experimental assays, the CW, CM, and inoculum were subjected to physicochemical characterization. The following parameters were determined, and all measurements were performed in triplicate to ensure greater reliability:

Total Solids and Volatile Solids

Total Solids (TS) and Volatile Solids (VS) are critical parameters for assessing the organic matter available for anaerobic digestion. The determination of TS and VS was performed according to the Mexican Official Standard NMX-AA-034-SCFI-2015. Approximately 10 g of a representative sample were weighed and placed in a pre-weighed, heat-resistant crucible. The sample was then dried at 105 °C in a drying oven until a constant weight was achieved, ensuring all the water content had evaporated. After drying, the crucible was removed from the oven and allowed to cool in a desiccator to prevent moisture absorption from the air. The weight of the dried sample and crucible were recorded, and the TS calculated using the formula:

$$TS\left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{Final\ weight\ of\ the\ crucible\ with\ residue\ (g) - initial\ weight\ of\ the\ empty\ crucible\ (g)}{Sample\ (g)} x\ 1000$$

Following the TS determination, the dried sample was combusted in a muffle furnace at 550 °C for 2 hours. After combustion, the crucible was removed from the furnace and allowed to cool in a desiccator. The weight of the ash remaining in the crucible was recorded. The VS were then calculated using the formula:

$$VS\left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{Crucible\ weight\ with\ TS\ (g) - Crucible\ weight\ after\ calcination\ (g)}{Sample\ (g)} x\ 1000$$

pH

The pH of the samples is an essential parameter for maintaining optimal conditions for AD. The pH measurement was conducted using an OAKTON® WD-35619-series potentiometer, following the Mexican Official Standard NMX-AA-008-SCFI-2016. The potentiometer was calibrated with standard buffer solutions at pH 4.0, 7.0 and 10. The electrode was then immersed in the sample, and the pH value was recorded once the reading stabilized.

Chemical Oxygen Demand

The Chemical Oxygen Demand (COD) indicates the amount of organic matter present in the samples. The COD was determined by closed reflux with a Spectroquant® Prove 100 spectrophotometer, using the photometric method 5000-90000 mg L^{-1} Spectroquant® to DIN ISO 15705. A known volume of the sample was added to a digestion vial containing a pre-

measured amount of potassium dichromate in sulfuric acid. The vial was sealed and heated in a reactor for 2 h to allow complete oxidation of the organic matter. After cooling, the absorbance was measured at 600 nm using the spectrophotometer, and the COD value was calculated based on the calibration curve prepared with standard solutions.

Biogas Characterization

The biogas generated during the experimental assays was stored in 1.5 L medical-grade plastic enteral feeding bags, equipped with stop valves (three-way). To quantify the captured biogas, the liquid displacement method was employed. An inverted flask, adapted with valves and filled with distilled water, was used to displace the biogas. The displaced volume was then measured using a 100 mL graduated cylinder (Aguilar-Aguilar *et al*., 2017). The Multitec® 540 equipment has proven to be an indispensable tool in our research, as it is used to measure and analyze the composition of gases in biological processes, detecting up to five different gases, including methane CH_4, CO_2, carbon monoxide CO, hydrogen sulfide H_2S, and oxygen O_2 (Figure 2). It is worth noting that the presence of CH_4 in a range of 50 to 70 % in the samples indicates the presence of methanogenic bacteria in the inoculum used in this study. During the measurement of biogas, the Multitec® 540 equipment played a pivotal role in allowing us to accurately quantify the concentration of these gases in each of the experimental assays, as illustrated in Figure 2.

From Figure 3, it is evident how the biogas generated in each assay was stored in the bag identified as (4), and subsequently, we used the Multitec® 540 equipment to conduct a detailed characterization of its composition (Figure 3). This device provided essential data that proved crucial in understanding and evaluating CH_4 production in our experiments, significantly contributing to the results and conclusions of our study.

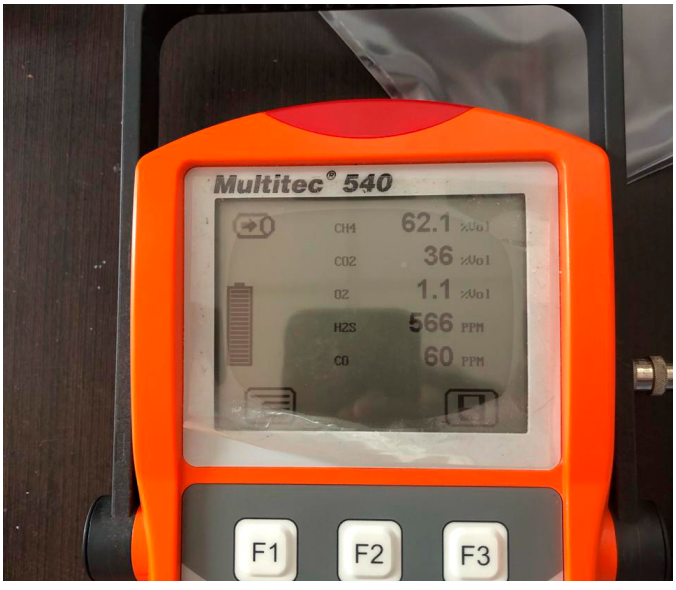


Figure 2. Multitec® 540 equipment used for the characterization of biogas from each of the experimental trials with the mixture of cattle manure and cheese whey.
Figura 2. Equipo Multitec® 540 utilizado para la caracterización del biogás de cada uno de los ensayos experimentales con la mezcla de estiércol de ganado y suero de queso.

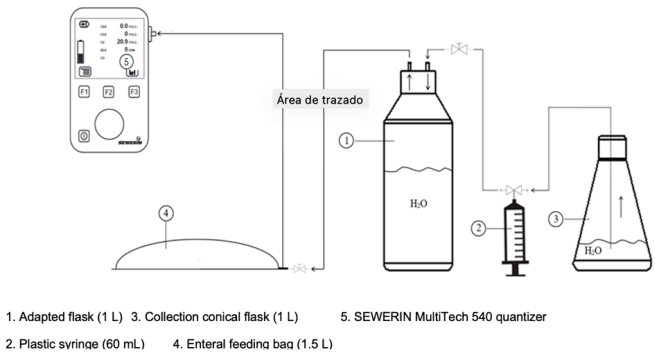


Figure 3. Diagram of the biogas characterization analysis.
Figura 3. Diagrama de análisis de caracterización del biogás.

Statistical analysis

To assess the CH_4 production potential, this study implemented a mixed experimental design, focusing on the added proportions of two specific wastes: cattle manure (X1) and cheese whey (X2). The mixing of these components was carried out according to a mixed experimental design (Table 1). This design aimed to achieve as homogeneous a mixture as possible to maintain consistency across experimental batches. The proportions of X1 and X2 were determined using a predefined matrix that allowed for an exhaustive analysis of the design space, covering a broad range of possible combinations.

Statistical analysis was used to interpret the data obtained. This included significance tests to determine if the differences in CH_4 production were the result of the variations in the proportions of the wastes and not due to random variation. In addition to biogas production, the homogeneity of the mixture was evaluated in each trial. This was done through physical and chemical tests to ensure that the waste mixture was consistent and uniform throughout all experiments.

The biogas production results obtained from the anaerobic digestion were analyzed using StatSoft software. An analysis of variance (ANOVA) was conducted to determine if there were significant differences between the experimental trials in co-digestion and mono-digestion. To further evaluate the differences, a Tukey test was performed at a significance level of 5 %. The purpose of this analysis was to identify the best BMP assay that demonstrated superior biogas production, which could then be selected for further evaluation in the UASB reactor at a laboratory scale. By comparing the results and conducting statistical tests, the study aimed to determine the most promising assay for subsequent testing and implementation.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of cattle manure and cheese whey (CW)

The results indicate that the CM had a TS content of 425 g L^{-1}, but a low biodegradability (32.7 %) as determined by the VS to TS ratio. On the other hand, the CW had a TS content of 55.9 g L^{-1} and maintained a higher VS/TS ratio of 82.5 % (Table 3). These findings align with a study by Fagbohungbe *et al.* (2019) which also highlighted the low biodegradability and biogas production potential of CM, emphasizing the need for a readily biodegradable co-substrate like CW to enhance biogas production. The pH values of CM and CW were measured to be 6.8 and 3.9, respectively. These pH values can be complementary to stabilize the overall pH AD digestion or CoAD processes. According to Appels *et al.* (2008) maintaining a pH between 6.5 and 7.5 is crucial for process stability and optimal biogas production. Additionally, the COD values for CM and CW were determined to be 89 g L^{-1} and 59 g L^{-1}, respectively (Table 3). These results are in line with expectations, as CM contains a higher concentration of organic matter compared to CW, which has a more liquid composition with a lower organic matter content. Overall, the physicochemical characterization of CW, CM, and inoculum provided valuable insights into their biodegradability, pH, and organic matter content, which are crucial parameters for AD and CoAD processes.

From Table 4, it is evident that the final VS concentrations of the anaerobic CoAD trials, specifically the CoAD 50CM:50CW, CoAD 30CM:70CW, and CoAD 20CM:80CW, were 8.80 g L^{-1}, 9.63 g L^{-1}, and 9.47 g L^{-1}, respectively (Table 4). These values indicate that these trials had lower VS concentrations compared to the other assays, and lower than the initial VS concentrations at the beginning of the process. Furthermore, the pH values at the beginning of the anaerobic digestion were recorded as 7.5, which falls within the recommended range (6.5 to 7.5) for an adequate AD treatment. Some reactors maintained their pH within this suggested range until the end of the process (Table 4). These findings suggest that the anaerobic co-digestion trials with different proportions of CM and CW (CoAD 50CM:50CW, CoAD 30CM:70CW, and CoAD 20CM:80CW) exhibited effective biodegradation of volatile solids and maintained appropriate pH levels throughout the digestion process. According to the results, it was observed that the CoAD 20CM:80CW treatment did not remain stable throughout the anaerobic co-digestion. This instability may be attributed to an inhibition process or the spontaneous consumption of carbohydrates, leaving behind only the fibrous material in the reactors.

Table 3. Physicochemical characterization of CW and CM organic waste and inoculum.
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de los residuos orgánicos e inóculo de LS y EB.

Parameters	Cattle manure	Cheese whey	Inoculum
pH	6.8±0.0	3.9±0.0	6.9±0.0
TS (g L^{-1})	425±1.0	55.9±0.13	11.56±0.14
VS (g L^{-1})	139±0.28	46.2±0.15	7.66±0.15
VS/TS (%)	32.7	82.75	66.26
COD (g L^{-1})	89±1.41	59±0.70	14.8±0.84

TS=Total solids, VS=Volatile solids, COD= Chemical Oxygen Demand.
ST=Sólidos totales, SV=Sólidos volátiles, DQO= Demanda química de oxígeno.

Kinetics of biogas production

Figure 3 displays the methane production curves for each of the treatments, showing the three characteristic periods described by Guerrero-Toledo *et al.* (2020), lag phase, exponential phase, and stationary phase. The co-digestion treatments demonstrated the best methane production yields, with the highest observed in the 70CM:30CW treatment (223.54 mL CH_4 g^{-1} VS) and the 50CM:50CW treatment (215.82 mL CH_4 g^{-1} VS) (Figure 3). These treatments exhibited stable kinetics throughout the anaerobic digestion process. The results indicate that the co-digestion treatments resulted in higher biogas yields compared to the mono-digestion treatments. This suggests that the combination of CM and CW in different proportions improved the biodegradability and methane production efficiency of the substrates.

The research conducted by Álvarez *et al.* (2010) indicates that anaerobic co-digestion can lead to a significant increase in biogas production compared to mono-digestion, with potential improvements of up to 200 %. The specific increase in biogas production may vary depending on the operational conditions and the characteristics of the substrates used. In the current study, the 30CM:70CW co-digestion treatment generated 130 % more biogas compared to the CM mono-digestion treatment (Figure 3). This highlights the effectiveness of co-digestion and the high biodegradability of CW. The rapid and higher biogas production observed in the first five days of the co-digestion treatment, indicates the potential of CW as a substrate for methane production. However, it is important to note that successful and efficient degradation requires appropriate control and management of the co-digestion process. The results of this study demonstrate that all co-digestion treatments outperformed the mono-digestion treatment, confirming the potential of co-digestion for enhancing biogas production. The high biodegradability of CW makes it a promising waste substrate for achieving methane production in a shorter timeframe, provided that proper control and management strategies are implemented.

Biogas production

The yields of accumulated biogas production and biogas regarding volatile solids (VS) for each treatment are presented in Table 5. These values were subjected to a mean comparison test using Analysis of Variance (ANOVA) with a significance level of 5 % ($p < 0.05$). These indicate a significant difference between the anaerobic mono-digestion and co-digestion of the CW/CM mixture. Furthermore, when comparing the CoAD 50CM:50CW and CoAD 30CM:70CW treatments, no significant differences in biogas production were observed. The biogas production values for these treatments were 215.82 mL CH_4 g^{-1} VS and 223.54 mL CH_4 g^{-1} VS, respectively,

Table 4. Initial and final values of total and volatile solids for batch tests in co-digestion (CoAD) and mono-digestion (MoDA).
Tabla 4. Valores iniciales y finales de sólidos totales y volátiles para pruebas discontinuas en codigestión (CoDA) y monodigestión (MoDA).

Assays	$pH_{Initial}$	$TS_{Initial}$ (g L^{-1})	TS_{Final} (g L^{-1})	$VS_{Initial}$ (g L^{-1})	VS_{Final} (g L^{-1})
CoAD 80CM:20CW	7.5	18.80 ± 0.36	18.60 ± 3.29	11.50 ± 0.17	10.60 ± 2.02
CoAD 70CM:30CW	7.5	18.20 ± 0.88	18.57 ± 1.70	11.50 ± 0.62	10.23 ± 1.05
CoAD 50CM:50CW	7.5	16.07 ± 1.50	15.63 ± 2.75	10.87 ± 0.14	8.80 ± 1.83
CoAD 30CM:70CW	7.5	17.57 ± 0.51	16.10 ± 2.77	12.60 ± 0.65	9.63 ± 2.14
CoAD 20CM:80CW	7.5	19.27 ± 0.41	14.83 ± 1.25	14.30 ± 0.20	9.47 ± 1.05
MoAD Cattle manure	7.5	17.55 ± 0.35	19.90 ± 0.65	10.70 ± 0.28	11.20 ± 0.26
MoAD Cheese whey	7.5	17.97 ± 0.11	17.03 ± 2.26	14.40 ± 0.00	10.17 ± 1.51
MoAD Inoculum	7.5	7.30 ± 0.20	8.17 ± 0.05	5.16 ± 0.11	5.63 ± 0.15

TS=Total solids, VS=Volatile solids.
ST=Sólidos totales, SV=Sólidos volátiles.

Table 5. Comparison of CH_4 production in the different essyas with different CW and CM mixtures in anaerobic digestion (AD) and anaerobic co-digestion (CoAD).
Tabla 5. Comparación de la produccion de CH_4 en los diferentes ensayos con diferentes mezclas de LS y EB en digestion anaerobia (DA) y co-digestion anaerobia (CoDA).

Assays	Cumulative biogas (mL)	Biogas (mL ton^{-1} VS)
CoDA 80EB:20L	138.62 ± 21.73	^{bc}172.20 ± 27.0
CoDA 70EB:30L	129.49 ± 11.61	b160.86 ± 14.42
CoDA 50EB:50L	164.20 ± 4.70	c215.82 ± 6.18
CoDA 30EB:70L	197.16 ± 12.55	^{a}223.54 ± 14.23
CoDA 20EB:80L	52.65 ± 3.88	^{d}52.60 ± 3.87
MoDA EB	72.80 ± 3.06	^{d}97.19 ± 4.09
MoDA LS	66.52 ± 6.38	^{d}65.99 ± 6.33

Different letters (a, b, c, d, and e) show significant differences between treatments (*p-value*> 0.05).
Letras diferentes (a, b, c, d, y e) muestran diferencias significativas entre tratamientos (*valor-p* > 0.05).

which are very close in value (Ergüder *et al*., 2001). This suggests that these two treatments resulted in similar levels of methane production efficiency. The ANOVA test allowed for a statistical comparison of the different treatments, revealing the significant differences in biogas production between mono-digestion and co-digestion, as well as the similarities between certain co-digestion treatments in terms of CH_4 yield.

CH_4 production varies significantly among the different mixtures studied, particularly highlighting the differences between those with high proportions of CM (CoDA 30CM:70CW) and those with high contents of CW (CoDA 20CM:80CW), as well as the more balanced mixtures (CoDA 50CM:50CW) (Figure 4 and Table 5). Interestingly, the monoculture mixtures of CM (MoDA CM) and CW (MoDA CW) did not show significant differences between them, but they did in comparison with most of the other mixtures, especially those with a higher proportion of CM. Notably, the CoDA 30CM:70CW mixture stands out significantly from all others, indicating that this specific proportion is the most effective for CH_4 production (Figure 4 and Table 5). This suggests a notable synergistic effect in biogas production when specific proportions of CM and CW are used. On the other hand, the mixture with the lowest CH_4 production was CoDA 20CM:80CW, underscoring how specific variations in mixture composition can significantly influence biogas production performance.

It is important to note that no significant differences were found between some specific mixtures, such as CoDA 70CM:30CW and CoDA 80CM:20CW (Figure 4 and Table 5). This finding suggests that minor adjustments in the proportion of components do not necessarily result in significant changes in CH_4 production, which could indicate a threshold in the benefit of adjusting the proportions of the substrates used.

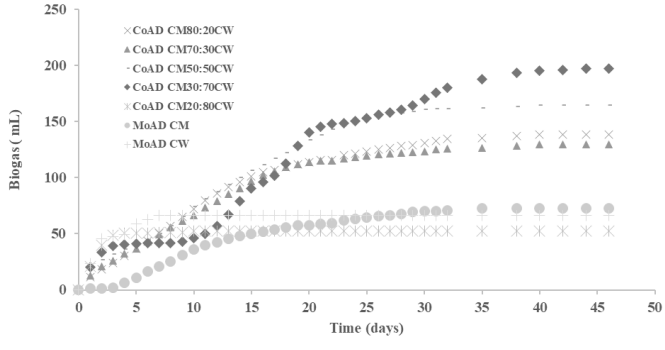


Figure 4. Kinetics biogas yield accumulated in the different treatments in mono-digestion (MoDA) and co-digestion (CoDA) in batch tests.
Figura 4. Cinética del rendimiento de biogás acumulado en los diferentes tratamientos en monodigestión (MoDA) y codigestión (CoDA) en pruebas discontinuas.

The visualization of these differences through the confidence interval graph, provides an intuitive graphical representation of the statistical significance between groups, with non-overlapping lines indicating significant differences. This graphical analysis highlights how the specific composition of the mixtures critically influences biogas production, offering valuable insights for optimizing biogas production. The CoDA 30CM:70CW mixture, in particular, emerges as the most promising for efficient biogas production, suggesting that the precise balance between CM and CW can play a key role in maximizing biogas production.

These findings have significant implications for the design and operation of biogas production processes, suggesting that careful selection of substrate proportions can substantially improve production efficiency. This detailed analysis and interpretation of the results provide a solid foundation for future research in the field of biogas production, guiding towards more effective strategies for the management of organic waste and the production of renewable energy.

Energy recovery from biogas and methane

The BMP assays yielded an average of 62.1 % CH_4, establishing a basis for estimating the energy generated in each trial shown in Table 6. According to the study by Castellanos-Sánchez *et al*. (2023) biogas with a 60 % CH_4 content can produce between 18 to 22 MJ per cubic meter, while pure CH_4(100 %) reaches between 30.67 to 36.68 MJ per cubic meter. Based on these averages, the energy generated in each trial was estimated.

As shown in Table 6, the CoAD 30CM:70CW mixture generated the highest amount of energy per ton of dry matter, both in biogas and CH_4, with 4,671.24 MJ/ton and 4,674.71 MJ/ton, respectively. This result underscores the potential of the combination of CW and CM for energy production through AD. Additionally, the biogas from the CoAD 50CM:50CW mixture and the methane from CoAD 80CM:20CW (4,509.92 MJ/ton and 4,513.27 MJ/ton respectively) showed superior energy per ton compared to conventional sources. Despite being lower than the 32,000 MJ/m^3 of gasoline, these results position biogas and methane competitively with natural gas and far exceed the energy content of wood. Despite the similarities in energy yield between biogas and CH_4 purified biomethane can be utilized as a high-quality fuel capable of competing with conventional fuels. Purified biomethane has the added advantage of not corroding pipes and machinery, making it a more durable and reliable option for energy applications (Noor *et al*., 2013).

These findings highlight the efficiency of biogas and CH_4 as sustainable alternatives to fossil fuels and traditional biomass. The adoption of technologies based on these renewable sources can transform the energy landscape by reducing dependence on non-renewable fuels, minimizing greenhouse gas emissions, and promoting a green energy economy. The large-scale implementation of these energy solutions opens a promising path toward a cleaner and renewable future, demonstrating the viability and potential of these sources to significantly contribute to energy sustainability (Lönnqvist *et al*., 2018).

Substrate Evaluation in a UASB reactor

The results of the biogas production assays in the UASB reactor showed that the highest yields were obtained when using a higher concentration of CW and a lower concentration of CM. This combination improved the carbon-to-nitrogen ratio, nutrient supply, and synergy between the substrates, resulting in enhanced biogas production. After the reactor start-up, where only inoculum and nutrients were added to allow microorganisms to establish a biofilm on the reactor surfaces, the addition of 100 mL of CW (MoAD CW) initiated biogas production. The CoAD CW95:05CM treatment achieved an average daily production of 687 mL of biogas, with a total production of 10,300 mL, and 50.77 % CH_4 content in the biogas (see Figure 5). For the CoAD CW90:10CM treatment, the average daily production was 1,240.78 mL of biogas, with a total production of 19,099 mL and 50.25 % methane content. The CoAD CW85:15CM treatment generated an average daily production of 1,597 mL of biogas, with a total production of 23,116 mL. It is noteworthy that as the concentration

Table 6. Energy potential of biogas and CH_4 production from the anaerobic digestion and co-digestion of CM with CW.
Tabla 6. Potencial energético de la producción de biogás y CH_4 proveniente de la digestión y codigestion anaerobia del EB con LS.

CM (%)	CW(%)	Assays	Biogas (m^3 ton^{-1}VS)	Methane (m^3 ton^{-1}VS)	Biogas (MJ/ton)	Methane (MJ/ton)
80	20	CoAD 80CM:20CW	172.20	106.94	3598.40	3601.08
70	30	CoAD 70CM:30CW	160.86	99.89	3361.44	3363.93
50	50	CoAD 50CM:50CW	215.82	134.02	4509.92	4513.27
30	70	CoAD 30CM:70CW	223.54	138.82	4671.24	4674.71
20	80	CoAD 20CM:80CW	52.60	32.66	1099.16	1099.98
100	0	MoAD CM	97.19	60.35	2030.95	2032.45
0	100	MoAD CW	65.99	40.98	1378.97	1379.99

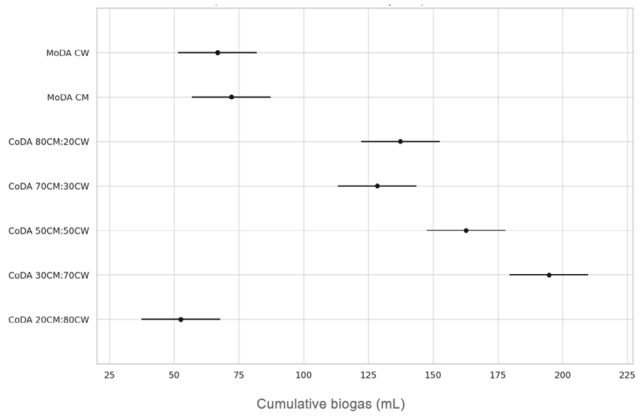


Figure 4 . Comparison of means using the Tukey test to produce biogas from the different mixtures of CM and CW in AD and CoAD.
Figura 4 . Comparación de medias mediante la prueba de Tukey para la produccion de biogás de las diferentes mezclas entre el CM y CW en DA y CoDA.

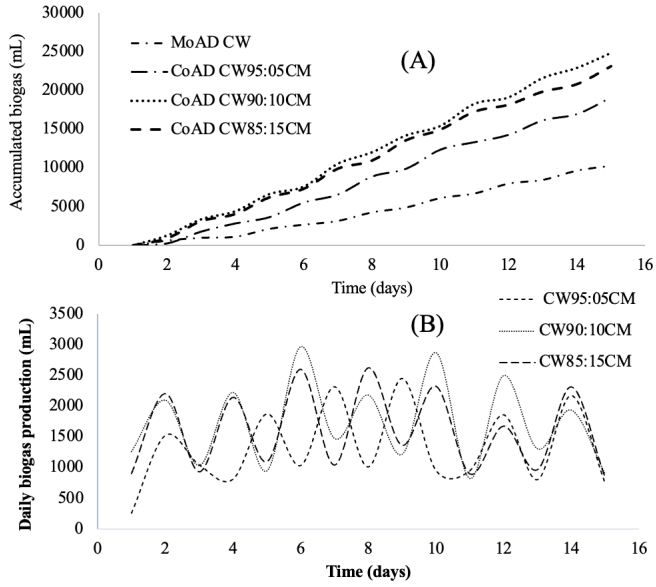


Figure 6. Accumulated (A) and daily biogas (B) production from CM and CW mixtures in CoAD within the UASB reactor.
Figura 6. Producción acumulada (A) y diaria (B) de biogás de mezclas de CM y LG en CoDA dentro del reactor UASB.

of CW decreases below 90 %, biogas production increases (Figure 5). The pH of the system remained stable within the range of 6.5 - 7.2, which is favorable for anaerobic digestion. However, once a 50 % CW concentration is reached, the accumulated biogas production starts to decrease, possibly due to the increase in fibrous material contributed by the CM. The use of a biofilm with porous material in the reactor had a positive effect on biogas production, since by keeping the microbial consortium attached to the biofilm, the waste mixture could be more efficiently and rapidly consumed, leading to improved biogas production. These findings suggest that the combination of a higher concentration of CW and a lower concentration of CM, along with the use of a biofilm, can optimize biogas production in anaerobic digestion processes.

The kinetics of biogas production varied among the different assays, with notable differences in the amount of biogas generated. The CoAD CW90:10CM assay exhibited the highest biogas production, reaching 2,964 mL in 24 h on the sixth day of the evaluation. In comparison, the CW85:15CM assay produced 2,604 mL of biogas, and the CoAD CW90:05CM mixture produced 1,036 mL (Figure 5). The use of a biofilm with a porous material had a positive effect on biogas production, as it facilitated the attachment and activity of the microbial consortium. This led to greater and faster consumption of the waste mixture, resulting in increased biogas production. The pH inside the reactor is an important indicator of process stability in anaerobic digestion. A pH range of 6.5 to 7.5 is considered favorable for maintaining biogas production, while values outside this range can indicate an inhibition process (Appels *et al*., 2011). In this study, the pH fluctuated in all treatments, as shown in Figure 6, but remained within the favorable range. This indicates that there was stability in the anaerobic digestion process inside the reactor, despite the variation in the concentration of CW and CM. Although the pH of the mixtures was initially acidic, ranging from 3.8 to 4.0, which could potentially lead to medium acidification, the observed biogas production process remained stable (Figure 6). This suggests that the microbial consortium adapted and maintained its activity, resulting in sustained biogas production throughout the evaluation period.

Our results show that both, co-digestion and anaerobic mono-digestion, of CW led to biogas production within the first 24 h of operation in the UASB reactor under mesophilic conditions (28 °C). In all treatment trials, a CH_4 concentration greater than 50 % was obtained, which is consistent with the findings of Neshat *et al.* (2017) who also reported methane concentrations of approximately 50 %. Specifically, the CoAD CW90:10CM mixture had an average CH_4 concentration of 62.25 %, indicating a high CH_4 content in the biogas produced (Figure 7). The CoAD CW85:15CM mixture exhibited a slightly lower methane concentration (56.43 %), and the

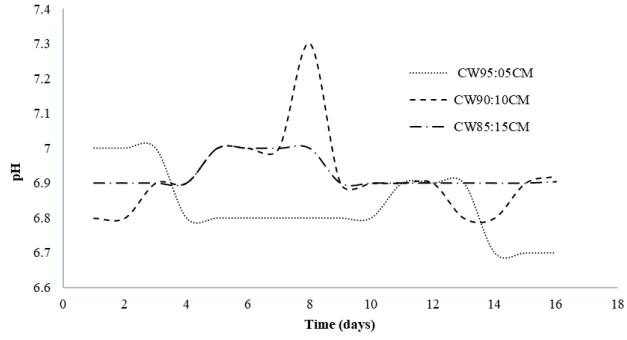


Figure 7. Monitoring of the pH value in anaerobic co-digestion treatments in the UASB reactor.
Figura 7. Monitorización del valor de pH en los tratamientos en codigestión anaerobia en el ractor UASB.

CoAD CW95:05CM mixture had a methane concentration of 54.55 %. It is important to note that the CoAD CW85:15CM treatment has a higher CM concentration and a lower CW concentration. Therefore, based on these results, it is considered that the use of a mixture consisting of 90 % CW and 10 % CM in an up-flow reactor is an appropriate configuration for achieving optimal CH_4 production.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The study confirms that co-digesting CW with CM significantly boosts biogas yield, especially with a dominant CW proportion. Employing a UASB reactor and porous materials for biofilm support emerges as a potent method for this process, resulting in robust biogas production. High CW mixtures excel in both biogas yield and methane richness, presenting a promising avenue for energy conversion into heat or electricity. The practicality and scalability of this approach suggest its potential for extensive adoption, promoting the sustainable management of agricultural waste streams. Furthermore, the digestate, a nutrient-rich byproduct, could be repurposed as a biofertilizer, with future research needed to devise safe and efficient application strategies that consider nutrient balance, environmental impact, and compliance with regulations.

Future research can focus on optimizing the design and operation of UASB reactors for enhanced biogas production, including the integration of advanced materials and technologies to improve microbial activity and substrate utilization. Scaling up the process to pilot-scale trials will be crucial to assess the feasibility and efficiency of large-scale biogas production from CW and CM, addressing practical challenges and refining the process parameters. Exploring the integration of biogas production with other renewable energy systems, such as solar or wind power, can result in hybrid energy solutions that maximize resource utilization and energy output. Comprehensive economic and environmental assessments will be essential to evaluate the cost-effectiveness, sustainability, and overall impact of implementing anaerobic co-digestion of CW and CM on a larger scale. Engaging with policymakers to develop supportive regulations and incentives for the adoption of biogas technologies, can drive the transition toward a green energy economy, ensuring that the benefits of this sustainable energy source are realized. These perspectives highlight the potential advancements and areas of focus that can further enhance the viability and impact of biogas production from CW and CM, contributing to a sustainable and renewable energy future.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), Facultad de Ciencias Agronómicas of the Universidad Autónoma de Chiapas, Cuerpo Académico de Agroforestería Pecuaria, The Laboratorio Nacional de Desarrollo y Aseguramiento de la Calidad en Biocombustibles (LaNDACBio) of the Instituto Politécnico Nacional and the Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad (DOCAS).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Aguilar-Aguilar, F.A., Nelson, D.L., Pantoja, L. de A. and Santos, A. 2017. Study of anaerobic co-digestion of crude glycerol and swine manure for the production of biogas. Rev Virtual Quim, (9): 2383-2403.

Álvarez, J., Otero, L. and Lema, J. 2010. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. Bioresour. Technol, (101): 1153-1158.

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J. and Dewil, R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Prog. Energy Combust. Sci, (34): 755-781.

Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van Impe, J. and Dewil, R. 2011. Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. Renew. Sustain. Energy Rev, (15): 4295-4301.

Castellanos-Sánchez, J.E., Aguilar-Aguilar, F.A., Hernández-Altamirano, R., Venegas Venegas, J.A. and Raj Aryal, D. 2023. Biogas purification processes: review and prospects. Biofuels, pp.1-13.

Chatterjee, P., Ghangrekar, M. and Rao, S. 2018. Sludge granulation in an UASB–moving bed biofilm hybrid reactor for efficient organic matter removal and nitrogen removal in biofilm reactor. Environ. Technol, (39): 298-307.

Da Silva, C., Astals, S., Peces, M., Campos, J. and Guerrero, L. 2018. Biochemical methane potential (BMP) tests: Reducing test time by early parameter estimation. Waste Manag, (71): 19-24.

Ergüder, T., Tezel, U., Güven, E. and Demirer, G. 2001. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. Waste Manag, (21): 643-650.

Esnoval, C.O.V., Ruiz, R.P., Hernández, R.R., de la Torre, J.C. and de Jesús, A.G. 2017. Uso, produc-ción y calidad nutricional del lactosuero en la región central de Chiapas. Av. En Investig. Agropecu, (21): 65-77.

Fagbohungbe, M.O., Onyeri, C.A. and Semple, K.T. 2019. Co-fermentation of whey permeates and cattle slurry using a partitioned up-flow anaerobic digestion tank. Energy, (185): 567-572.

Guerrero-Toledo, F. de M., Espinosa-Solares, T., Balagurusamy, N., Guerra-Ramírez, D., Huber, D. and Hernández-Eugenio, G. 2019. Biochemical methane potential of chicken litter added with propionate in mesophilic conditions. Sci. Agropecu, (10): 307-311.

Hublin, A., Schneider, D.R. and Džodan, J. 2014. Utilization of biogas produced by anaerobic digestion of agro-industrial waste: energy, economic and environmental effects. Waste Manag. Res, (32): 626-633.

Labatut, R.A., Angenent, L.T. and Scott, N.R. 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. Bioresour. Technol, (102): 2255-2264.

Magdalena, J.A., Greses, S. and González-Fernández, C. 2020. Anaerobic degradation of protein-rich biomass in an UASB reactor: organic loading rate effect on product output and

microbial communities dynamics. J. Environ. Manage, (274) : 111201.

Mainardis, M., Cabbai, V., Zannier, G., Visintini, D. and Goi, D. 2017. Characterization and BMP tests of liquid substrates for high-rate anaerobic digestion. Chem. Biochem. Eng. Q. 31, 509-518.

Mazorra-Manzano, M.Á. and Moreno-Hernández, J.M. 2019. Properties and options for the valorization of whey from the artisanal cheese industry. CienciaUAT 14, 133-144.

Molino, A., Nanna, F., Ding, Y., Bikson, B. and Braccio, G. 2013. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. Fuel 103, 1003-1009.

Náthia-Neves, G., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. and Forster-Carneiro, T. 2018. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. Int. J. Environ. Sci. Technol. 15, 2033-2046.

Neshat, S.A., Mohammadi, M., Najafpour, G.D. and Lahijani, P. 2017. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. Renew. Sustain. Energy Rev. 79, 308-322.

Noor, M.M., Wandel, A.P. and Yusaf, T. 2013, January. The development of MILD combustion open burner experimental setup. In Proceedings of the 2nd International Conference of Mechanical Engineering Research (ICMER 2013). University of Southern Queensland.

Lönnqvist, T., Sandberg, T., Birbuet, J.C., Olsson, J., Espinosa, C., Thorin, E., Grönkvist, S. and Gómez, M.F. 2018. Large-scale biogas generation in Bolivia stepwise reconfiguration. Journal of cleaner production, 180, pp.494-504.

OECD, Food, Nations, A.O. of the U. 2021. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2021-2030. https://doi.org/10.1787/47a9fa44-es

Ohimain, E.I. and Izah, S.C. 2017. A review of biogas production from palm oil mill effluents using different configurations of bioreactors. Renew. Sustain. Energy Rev. 70, 242-253.

Piñas, J.A.V., Venturini, O.J., Lora, E.E.S., Oliveira, M.A. de and Roalcaba, O.D.C. 2016. Aterros sanitários para geração de energia elétrica a partir da produção de biogás no Brasil: comparação dos modelos LandGEM (EPA) e Biogás (Cetesb). Rev. Bras. Estud. Popul. 33, 175-188.

Sebastián-Nicolás, J.L., González-Olivares, L.G., Vázquez-Rodríguez, G.A., Lucho-Constatino, C.A., Castañeda-Ovando, A. and Cruz-Guerrero, A.E. 2020. Valorization of whey using a biorefinery. Biofuels Bioprod. Biorefining 14, 1010-1027.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Población de Ganado de carne y leche 2012-2021. [Consultado: Febrero 20, 2023] Disponible en: http:/ www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762.

Venegas Venegas, J.A., Espejel García, A., Pérez Fernández, A., Castellanos Suárez, J.A. and Sedano Castro, G. 2017. Potencial de energía eléctrica y factibilidad financiera para biodigestores motogenerador en granjas porcinas de Puebla. Rev. Mex. Cienc. Agríc, (8): 735-740.

Vera-Romero, I., Estrada-Jaramillo, M., González-Vera, C., Tejeda-Jiménez, M., López-Andrade, X. and Ortiz-Soriano, A. 2017. Biogás como una fuente alternativa de energía primaria para el Estado de Jalisco, México. Ing. Investig. Tecnol, 18, 307-320.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Efecto de dos tipos de contenedores y dos tipos de fertilización en el crecimiento de patrones de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de vivero

Effect of two types of containers and two types of fertilization on the growth of cocoa (*Theobroma cacao* L.) rootstocks under nursery conditions

M. Rivera-Rojas[1]*, A.R.Caballero-Lopez[1], J.A. Arias-Rojas[1], Y. Romero-Barrera[2], D.F. Lombo-Ortiz[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Agrosavia, C.I Motilonia, Km. 5 vía Becerril - Agustín Codazzi, Colombia.

[2] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Agrosavia, C.I Tibaitata, Km. 14 vía Mosquera -Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Colombia cuenta actualmente con un Plan Nacional para la gestión sostenible de plásticos de un solo uso, el cual propone en una de sus metas para el año 2030, que el 100 % de los plásticos de un solo uso, sean reutilizables, reciclables o compostables. A partir de esta necesidad, este proyecto de investigación se propuso como objetivo general la validación técnica de la producción de plántulas de cacao a partir del uso de un medio de propagación aséptico, definido comercialmente como Espuma Agrícola, sustrato a base de arenas y cales. La investigación se desarrolló en el vivero para La Paz ubicado en el Centro de Investigación Motilonia de AGROSAVIA, el cual es administrado por la Compañía Nacional de Chocolates. Como parámetro de comparación se tomó el protocolo de producción de plántulas a partir del uso de bolsas plásticas, el cual está estandarizado por la Compañía Nacional de Chocolates. Se evaluaron dos tipos de fertilización y dos tipos de contenedores (sustratos) incluida la espuma agrícola. Se encontró que existe una interacción entre el tipo de contenedor, tipo de fertilizante y el tiempo de la planta en vivero; mostrando que a los 90 días el mejor tratamiento en cuanto a la materia seca total de planta (MSP) fue la Espuma Agrícola con fertilización granular. Finalmente, los resultados muestran que el uso de la espuma es una tecnología viable para el desarrollo de plántulas de cacao dirigidas a patronaje.

Palabras clave: Espuma agrícola; producción; clon IMC 67; patrón; Desarrollo, biomasa aérea y radicular.

ABSTRACT

Colombia currently has a National Plan for the sustainable management of single-use plastics, which proposes in one of its goals that by 2030 all single-use plastics be reusable, recyclable or compostable. Based on this need, this research project proposed as a general objective the technical validation of the production of cocoa seedlings from the use of foams based on sand and lime, technological products available in the national market. The research was developed in the nursery for La Paz located at the Motilonia Research Center of AGROSAVIA, which is managed by the Compañía Nacional de Chocolates. As a comparison parameter, the seedling production protocol was taken from the use of plastic bags, which is standardized by the National Chocolate Company. Two types of fertilization and two types of containers (substrates) including Agricultural Foam were evaluated. It was found that there is an interaction between the type of container, fertilizer and time of the plant in the nursery, showing that at 90 days the best treatment in terms of total plant dry matter (PDM) was Agricultural Foam with granular fertilization. Finally, the results of this first phase of the research show that the use of foams is a viable technology for the development of cocoa seedlings for patronage.

Keywords: Agricultural foam, production, clone IMC 67; pattern; development; aerial and root biomass

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de importancia económica, según FAOSTAT (2020) se estimó un área cultivada mundial de 12,315,836 hectáreas (ha), que corresponde a una producción aproximada de 5,756,953 toneladas (t). Costa de Marfil se consolida como el mayor productor de grano de cacao con 2,200,000 t (38.2 %) seguido de Ghana, Indonesia y Nigeria, estos países conjuntamente concentran el 32.6 % de la producción mundial. En cuanto a la producción de cacao en el continente Americano Ecuador, Brasil, Perú, República Dominicana y Colombia, contribuyen con el 15.6 % de la producción.

En Colombia la producción de cacao representa una de las actividades de mayor impacto en sector rural, se estima que alrededor de 34,000 familias cacaocultoras están vinculadas a esta actividad, mientras el área sembrada se incrementó en un 61.2 % entre los años 2010 a 2020 y la producción para el 2021 alcanzó una cifra récord de 60,040 t con un incremento del 8.9 % respecto al periodo 2020 (FEDECACAO,2022). De acuerdo con UPRA (2022), en Colombia existen 16,750,716 ha con aptitud para cacao, lo que indica que solo el 1.3 % del área se encuentra establecida, a pesar de tener tierras aptas para el cultivo, su desarrollo en las zonas rurales ha sido afectado por los conflictos sociales, sin embargo, existe un potencial para producir cacaos finos y de aroma, el cual ofrece ventajas competitivas para el desarrollo sostenible del sector cacaocultor (Pabón *et al*., 2016).

*Autor para correspondencia: M. Rivera Rojas
Correo-e: mrivera@agrosavia.co
Recibido: 2 de junio de 2023
Aceptado: 29 de diciembre de 2023
Publicado: 13 de agosto de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2057

Las amplias expectativas de crecimiento de la cacaocultura en Colombia se sustenta sobre la base de un potencial de áreas para siembras nuevas, de acuerdo con UPRA (2022), se estima un área con aptitud 16, 750,716 ha para el cultivo de cacao, de la cual, tan solo el 1.3 % del área actual se encuentra ocupada, seguidamente el potencial de producir cacaos finos en sabor y aroma, que ofrece beneficios económicos y sociales diferentes para los productores de cacao en comparación con el mercado a granel (Abbott *et al*., 2017; Ríos *et al*., 2017) y finalmente las políticas nacionales de sustitución de cultivos ilícitos que priorizan la cadena productiva del cacao y políticas de desarrollo rural.

Dado el crecimiento en el área de cacao y el potencial de expansión en el territorio nacional, es imperativo implementar y desarrollar tecnologías de fertilización y de propagación vegetal que garanticen la calidad genotípica y morfológica de las plantas y al mismo tiempo la sostenibilidad ambiental durante su proceso. En la etapa de propagación el genotipo de cacao debe propagarse mediante técnica de gemación (injertación) sobre una plántula portainjerto (patrón) propagado a partir de semillas pregerminadas que generalmente se siembran directamente en contenedores de polietileno (Bolsas o tubetes) llenos de tierra o sustrato agrícola hasta la transferencia de la yema (Sodré y Gomes, 2019; Garate *et al*., 2020).

Es así como la eficiencia en la etapa de propagación del cacao es esencial para acelerar los programas de mejoramiento genético, evitar escasez de producción en el futuro y garantizar la producción del cultivo al largo plazo (Wickramasuriya y Dunwell, 2018). Actualmente, los estudios de propagación de material vegetal de cacao están enfocados a la efectos de sustratos de origen orgánico en contenedores de polipropileno (Tubete) y polietileno (Bolsa) con distintos volúmenes sobre características morfológicas y desarrollo de las plantas dado que son factores importantes para la producción de material vegetal (Gutiérrez *et al*., 2011; Osorio *et al*., 2017; Vargas *et al*., 2020; Aracelly-López *et al*., 2020).

Las bolsas de polietileno presentan especial atención por su mayor uso a nivel mundial en la producción de material vegetal por su bajo costo, facilidad de transporte y almacenamiento (Luna *et al*., 2012), sin embargo, presentan un único uso y difícil reutilización contribuyendo a la generación de impactos negativos en el medio ambiente, (Ahmed *et al*., 2012), por tanto, la imposición de restricciones y el desarrollo de sustitutos alternativos son los enfoques más comunes para abordar este problema (Amaraweera *et al*., 2021). Al respecto, Colombia cuenta el "Plan nacional para la gestión sostenible de plásticos de un solo uso", el cual propone en una de sus metas para el año 2030 que el 100 % de los plásticos de un solo uso puestos en el mercado, sean reutilizables, reciclables o compostables (Gobierno de la República de Colombia, 2021).

La puesta en marcha de este plan a nivel general demanda compromisos de todos los sectores económicos y actores de la sociedad y de manera particular el sector agropecuario puede contribuir mediante la reducción y sustitución de plásticos de un solo uso o de poca vida útil, como es el caso de los contenedores comúnmente empleados en vivero. Una de las alternativas emergentes para remplazar los plásticos es el uso de polímeros biodegradables, ya que no producen daños al medio ambiente y tienen un costo accesible (Amaraweera *et al*., 2021). Entre estos polímeros se destaca la espuma agrícola ULTRAFOAM® a base de arena y cal, que actualmente está disponible en el mercado nacional y que surge como una alternativa ambientalmente sostenible para la producción de material vegetal durante la etapa de vivero.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de dos sustratos y dos tipos de fertilización sobre el crecimiento de patrones de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de vivero para contribuir con la promoción de alternativas ambientalmente sostenibles para la producción masiva de plantas de calidad de cacao.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el vivero denominado "Cacao para la Paz" de la Compañía Nacional de Chocolate (CNCH) en convenio con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) con capacidad de producir 1.2 millones de plántulas anuales, ubicado en el Centro de Investigación Motilonia de AGROSAVIA, sobre las coordenadas 10°0'8,05''N y 73°14'50,76'' W en el municipio de Agustín Codazzi, Departamento del Cesar – Colombia)-. El centro de investigación se encuentra localizado en la zona de vida Bosque seco tropical Bs-T (Holdridge, 1967), a una elevación de 106 m s.n.m. temperatura media multianual (°Tmed) de 29 °C, con temperatura máxima y mínima de 34 °C y 24 °C, respectivamente. La humedad relativa es del 69.7 % y una precipitación promedio multianual de 1,581 mm/año (IDEAM, 2019).

Para el desarrollo del estudio se seleccionaron semillas híbridas de cacao del clon IMC 67 usado como patrón (porta injerto) universal para la injertación de clones de cacao. La semilla se recolectó del jardín Clonal Canaán, el cual posee registro ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ubicado en el municipio de La Paz, departamento del Cesar, Colombia. Las semillas se colocaron a pregerminar durante 24 a 72 horas en un almácigo compuesto por aserrín, el cual se cubrió con polisombra. Las semillas con la radícula emergida se sembraron en los dos tipos de contenedores, los cuales fueron: i. bolsa plástica que contenía suelo más cascarilla de arroz como sustrato y ii. espuma Agrícola. Es común que la cascarilla de arroz se utilice como mezcla en sustratos convencionales a base de suelo orgánico, pues se argumenta que mejora la oxigenación favoreciendo el desarrollo de las plántulas (Cruz-crespo *et al*., 2023).

Se colocó una semilla por contenedor a una profundidad no mayor al tamaño de esta y se cubrió con sustrato de la mezcla correspondiente (Santiago *et al*., 2015). Se utilizaron dos fertilizantes: i. Fertilizante granular de liberación controlada Basacote® (16N – 8P – 12K). Se empleó una dosis de 5 g/planta cuando las plantas cumplieron un mes de edad y ii. Drench: Hidrocomplex (12N - 11P - 18K - 2.65 MgO - 8S) en

una dosis de 0.5 g/L aplicado con bomba de espalda en cada sustrato. El fertilizante se aplicó cada 10 días a partir de los primeros 10 d de desarrollo de la planta, se evitó la utilización de fertilizantes con alto contenido de Nitrogeno (N) debido a que no presentan diferencias significativas en el crecimiento de plantulas en sus primeras fases en variables como altura y biomasa total (López-Arias *et al*., 2023).

Diseño experimental

Se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) con un arreglo bifactorial 2 contenedores x 2 tipos de fertilización para un total de cuatro tratamientos (Tabla 1) y cinco bloques (repeticiones). Cada unidad experimental estuvo constituida por 40 plantas y se muestrearon tres plantas por repetición, seleccionadas de la parte media para evitar efectos de borde (Bayala *et al*., 2009; Salto *et al*., 2013; Osorio *et al*., 2017; Castro *et al*., 2018; Luna, 2019). El experimento fue representado por el siguiente modelo (ecuación 1):

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + t_i + g_j + (tg)_{ij} + e_{ijk} \quad \text{Eq. (1)}$$

Donde, Yijk= Representa la observación para la k-ésima unidad experimental del nivel i del factor A (sustrato) y nivel j del factor B (fertilización) μ = media general; β_i= efecto del i-ésimo bloque t_i= representa el efecto causado por el nivel i del factor A; g_j= representa el efecto causado por el nivel j del factor B; $(tg)_{ij}$ = representa la interacción del nivel i del factor A y el nivel j del factor B; e_{ijk}= representa el término de error aleatorio asociado a la observación $_{ijk}$.

Variables y frecuencia de medición

El registro de las variables se desarrolló a los 30, 60 y 90 d después de la siembra en los contenedores. En cada evaluación se realizó el muestreo destructivo de tres plantas por repetición (n = 15) a las que se midió las variables: 1) diámetro a la base, medido a la altura del cuello de la raíz (mm) con el uso calibrador digital (Mitutoyo 500-157-30, precisión 0.01 mm), 2) longitud de la planta (cm) medido desde el cuello de raíz hasta la yema apical, 3) longitud de la raíz pivotante (cm), 4) número de hojas, 5) materia seca de la planta (g planta^{-1}) (Osorio *et al*., 2017; Angulo *et al*., 2021).

Las muestras de biomasa aérea y radicular fueron separadas en bolsas de papel Kraft, etiquetadas y secadas en horno a temperatura constante por 72 horas a 75 °C (Villalón *et al*., 2016). Después del secado, las fracciones de biomasa fueron pesadas con balanza digital de precisión Sartorius Germany (0.001 g) para obtener su peso seco. Finalmente, se determinó el índice de calidad de Dickson (Ecuación 2), el cual reúne varios atributos morfológicos en un solo valor, (Dickson *et al*.,1960; Villalón *et al*., 2016; Castro *et al*., 2018), a mayor valor del índice resultará una mejor calidad de planta (Muñoz *et al.,* 2015).

$$ICD = MST / (LP / DB + MSA / MSR) \quad \text{Eq. (2)}$$

Dónde, ICD es el índice de calidad de Dickson, MST es la materia seca de la planta (g), LP es la longitud de la planta (cm), DB es el diámetro a la base (mm), MSA es la materia seca de la parte aérea (g) y MSR es la materia seca de las raíces (g).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos empleados en el estudio.
Table 1. Description of the treatments used in the study.

Tratamiento	Sustrato	Fertilización
T1	Convencional: bolsa de polietileno con una dimensión de 15 cm x 30 cm calibre n°3 con sustrato compuesto por una mezcla de suelo y cascarilla de arroz en proporción 5:1	Fertilizante granular de liberación controlada Basacote® (16N – 8P – 12K). Se empleó una dosis de 5 g/ planta cuando las plantas cumplieron un mes de edad.
T2	Convencional: bolsa de polietileno con una dimensión de 15 cm x 30 cm calibre n°3 con sustrato compuesto por una mezcla de suelo y cascarilla de arroz en proporción 5:2	Fertilización en Drench: Hidrocomplex (12N - 11P - 18K - 2.65MgO - 8S) en una dosis de 0.5 gr/litro aplicado con bomba de espalda en cada sustrato. El fertilizante se aplicó cada 10 d a partir de los primeros diez días de desarrollo de la planta.
T3	Espuma ULTRAFOAM® (cubos sueltos de 5 cm x 5 cm x 20 cm). De acuerdo con el fabricante, es un medio sintético, biodegradable, completamente inerte, hecho con resinas fenólicas expandidas con cal dolomítica y arena.	Fertilizante granular de liberación controlada Basacote® (16N – 8P – 12K). Se empleó una dosis de 5 g/ planta cuando las plantas cumplieron un mes de edad.
T4	Espuma ULTRAFOAM® (cubos sueltos de 5 cm x 5 cm x 20 cm). De acuerdo con el fabricante, es un medio sintético, biodegradable, completamente inerte, hecho con resinas fenólicas expandidas con cal dolomítica y arena.	Fertilización en Drench: Hidrocomplex (12N - 11P - 18K - 2,65MgO - 8S) en una dosis de 0,5 gr/L aplicado con bomba de espalda en cada sustrato. El fertilizante se aplicó cada 10 d a partir de los primeros diez días de desarrollo de la planta.

Análisis de datos

Una vez registrada la información del estudio, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los contenedores (sustrato), tipo de aplicación del fertilizante y época de evaluación sobre las variables de crecimiento, cuando existían diferencias significas entre los tratamientos ($p < 0.05$), se realizó prueba de comparación de medias TUKEY empleando el procedimiento GML disponible en el programa estadístico SAS 9.4 (SAS Institute,2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diámetro a la base (DB)

El diámetro a la base del tallo es una característica importante en el crecimiento de plantas, ya que es el lugar de almacenamiento de nutrientes esenciales (Parra *et al*., 2012). La calidad y el crecimiento de este atributo garantiza la supervivencia de las plántulas en campo (Mexal y Landis, 1990). En la Tabla 2 se presentan los resultados de la comparación de medias TUKEY para los factores contenedores, fertilización, tiempo

Tabla 2. Comparación de medias TUKEY para las variables de crecimiento.
Table 2. Means for the study variables according to Tukey's test.

Fuente de Variación		LT	LR	DB	NH	MSP
Tiempo	90	-	-	6,91a	19,45a	-
	60	-	-	5,65b	13,03b	-
	30	-	-	3,95c	5,77c	-
Contenedor	Convencional	-	-	5,58a	-	0,92a
	Espuma	-	-	5,42b	-	0,81b
Contenedor x Tiempo	Convencional *90	-	34,63a	-	-	-
	Espuma *90	-	31,14ab	-	-	-
	Convencional*60	-	28,36b	-	-	-
	Espuma *60	-	28,61b	-	-	-
	Convencional*30	-	17,83c	-	-	-
	Espuma *30	-	21,12c	-	-	-
Fertilización x Tiempo	Granular*90	41,26a	-	-	-	-
	Drench*90	31,58b	-	-	-	-
	Granular*60	27,70c	-	-	-	-
	Drench*60	23,84d	-	-	-	-
	Granular*30	16,92e	-	-	-	-
	Drench*30	16,25e	-	-	-	-
Contenedor x Fertilización	Convencional*Granular	30,24a	-	-	14,44a	-
	Espuma*Granular	27,02b	-	-	12,58b	-
	Convencional *Drench	23,58c	-	-	11,69b	-
	Espuma*Drench	24,20c	-	-	12,29b	-
Contenedor x Fertilización x Tiempo	Espuma*Granular*90	-	-	-	-	7,17a
	Convencional*Drench*90	-	-	-	-	5,04b
	Espuma*Drench*90	-	-	-	-	4,16bc
	Convencional*Granular*90	-	-	-	-	7,12a
	Espuma*Drench*60	-	-	-	-	2,76d
	Espuma*Granular*60	-	-	-	-	3,14d
	Convencional*Drench*60	-	-	-	-	2,73d
	Convencional*Granular*60	-	-	-	-	3,63cd
	Convencional*Drench*30	-	-	-	-	1,78e
	Espuma*Drench*30	-	-	-	-	1,25e
	Espuma*Granular*30	-	-	-	-	1,27e
	Convencional*Granular*30	-	-	-	-	1,37e

LT: longitud del tallo (cm); LR: longitud de la raíz (cm); DB: diámetro a la base (mm); NH: número de hojas; MSP: materia seca de la planta (g). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

y sus interacciones. Al respecto, se hallaron diferencias significativas asociadas al tiempo de evaluación (30, 60 y 90 d), siendo el mejor valor el registrado a los 90 d (6.91 mm). Del mismo modo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tipo contenedores (convencional y espuma agrícola), a favor del contenedor convencional con un valor de 5.58 mm. Este resultado concuerda con algunos estudios para la variedad IMC 67, donde se evidenció que con la bolsa (1.6 L) se presentó un desarrolló entre 4 a 6 mm en un periodo de tiempo de 90 d el cual fue mayor al presentado en tubetes (0.4 L) pero sin diferencias estadísticas con la matera (3.0 L), indicando así que un mayor volumen y espacio del contenedor favorece el desarrollo del DB (Gutiérrez *et al*., 2011). En mediciones realizadas a los 45 y 105 d se obtuvo

el mayor valor promedio para diámetro de base en plántulas de cacao (5.84 mm y 7.63 mm) utilizando bolsa plástica de 14 x 30 cm con un peso de 1.5 kg (Villacorta *et al*., 2021). Por su parte, en un estudio donde se evaluó el efecto en el crecimiento de cuatro (4) dimensiones de bolsa después de 120 d se obtuvo que la mejor dimensión correspondió a 8 x 12 cm con 5.6 mm (Vargas *et al*., 2020). Si bien el resultado es similar al actual estudio, se presentó un menor tamaño de bolsa y en un mayor tiempo, es decir que el tamaño y altura del contenedor favorecen el crecimiento de cacao (Gutierrez y Rodriguez, 2011; Vargas *et al*., 2020; Villacorta *et al*., 2021) además de que contribuye con el crecimiento de la raíz lo que influye en la biomasa aérea (Osorio *et al*., 2017).

El aumento en los precios de los fertilizantes químicos y las posibilidades de valor agregado que generan los productos orgánicos ha generado interés en el mercado del cacao, por tal motivo se han realizo diversas investigaciones sobre su efecto en el crecimiento de plántulas en vivero. Lliuya (2015) obtuvo diferencias estadísticamente significativas con ocho tipos de abonos orgánicos, registrando lo valores máximos con compost y estiércol de cuy (5.13 mm y 5.08 mm) a los 60 d y con estos mismos abonos (6.8 mm y 6.55 mm) a los 90 d. Estos resultados son similares a los presentados en este estudio, donde se empleó fertilización química, lo cual ofrece oportunidades para ensayar el efecto de otras fuentes nutricionales en etapa de vivero.

Longitud de la raíz (LR)

Con relación a longitud de la raíz se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) asociadas a la interacción contenedor x tiempo (Tabla 3), sin embargo, se observa que las diferencias se relacionan con el tiempo de evaluación, es así como la longitud de la raíz en plantas de cacao sembradas en contenedor convencional y espuma agrícola fue similar bajo la influencia de un mismo tiempo de evaluación (Tabla 3). Las plantas en contendedor convencional (bolsa más sustrato) y espuma agrícola presentaron una LR promedio a los 90 d de 34.63 cm y 31.14 cm en su orden, valores similares a los encontrados por Osorio *et al.* (2017), quienes reportaron a los 240 días longitudes de raíces de 24.17 cm, 35.67 cm y 31.17 cm en plantas de cacao del genotipo IMC 67 sembradas en contenedores pequeño (0.01 m^3 y 25 cm de altura), mediano (0.02 m^3 y 45 cm de altura) y grande (0.10 m^3 y 70 cm de altura), respectivamente. Por otro lado, Aracelly-López *et al.* (2020) no encontraron diferencias estadísticas significativas en la longitud de raíces a los 60 días en diversos tratamientos para la preparación de sustratos, en este sentido, Osorio *et al.* (2017) y Aracelly-López *et al.* (2020) infieren que para favorecer el crecimiento radicular es importante usar sustratos sueltos y poco compactados, dado que el crecimiento de las raíces se relaciona inversamente con la resistencia a la penetración del suelo.

Los resultados obtenidos en el estudio son concluyentes y evidencia la respuesta positiva en crecimiento de raíces de plantas de cacao, lo cual es favorable considerando que la habilidad de las plantas para explorar el suelo está influenciada en gran medida por la distribución de las raíces en el perfil y las propiedades del suelo (Ramírez, 2016), por tanto, el proceso de formación de raíces debe promoverse desde las etapas de vivero.

Longitud del tallo (LT)

Los atributos morfológicos de una planta de cacao pueden correlacionarse con la supervivencia y el crecimiento inicial que tenga en terreno; mientras más grande sea la planta mayor será su prendimiento. En este sentido, la longitud del tallo alcanzado en la etapa de vivero juega un papel determinante, de ahí que la definición del sustrato y el tipo de fertilización debería afectar positivamente el desarrollo de este atributo. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el desarrollo de la variable Longitud del Tallo (LT) está determinado por las interacciones entre el tipo de fertilización y el tiempo, además de la interacción contenedor y tipo fertilización (tabla 3). Así, a los 90 d la fertilización granular fue el mejor tratamiento, alcanzando una longitud del tallo de 41.2 cm. Por su parte, en la interacción Contenedor x Fertilización, el mejor tratamiento fue el convencional con fertilización granular, seguido de la espuma agrícola con el miso tipo de fertilización. En el estudio realizado por Angulo *et al*. (2021) demostraron que la variable de altura de la planta estuvo influenciada por la cantidad de sustrato y el tiempo en vivero, es decir, a mayor cantidad de suelo en bol-

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para las variables de estudio.
Table 3. Analysis of variance for the study variables.

Fuente de variación	LT	DB	LR	NH	MSP
Tiempo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Contenedor	**0.0175**	**0.0411**	0.9836	0.0866	**0.0060**
Fertilización	**<0.0001**	0.0706	0.1257	**0.0001**	**<0.0001**
Contenedor x Tiempo	0.0837	0.1980	**0.0029**	0.9006	0.7818
Fertilización x Tiempo	**<0.0001**	0.4279	0.6256	0.0591	**<0.0001**
Contenedor x Fertilización	**0.0007**	0.0853	0.0530	**0.0014**	0.2019
Contenedor x Fertilización x Tiempo	0.0685	0.0673	0.6079	0.0602	**0.0318**

LT: longitud del tallo (cm); LR: longitud de la raíz (cm); DB: diámetro a la base (mm); NH: número de hojas; MSP: materia seca de la planta (g). Valores $p < 0,05$ son estadísticamente significativos.

sas de mayor tamaño a los 105 días se obtuvieron las plantas más altas con 48,.25 cm. Resultado similar al obtenido en este estudio a los 90 días con el tipo de fertilización granular.

Número de Hojas (NH)

El número de hojas es un buen indicador del desarrollo de las plántulas en la fase de vivero, se estima que a mayor número la tasa de fotosíntesis se incrementa y con ello habrá una mayor acumulación de biomasa, tanto en hojas, tallo y raíz. En este sentido se determinó efecto entre la interacción contenedor x fertilización sobre la producción de hojas, siendo mayor en plantas sembradas en contenedor convencional y con fertilización granular con 14.44 hojas, seguido de espuma y fertilización granular con 12.58 hojas. Mientras la interacción contenedor convencional x fertilización drench y espuma x fertilización drench presentaron 11.69 y 12.29 hojas respectivamente (Tabla 4). Este rango en la producción de hojas es similar el reportado por Aguirre *et al.* (2007) en plantas de cacao en vivero de 90 d de edad en sustrato de suelo inoculadas con *Azospirillum brasilense*, *Glomus intraradices* y testigo produjeron 10.80, 12.32 y 9.2 hojas respectivamente. Mientras, Ricárdez *et al.* (2020) reportó en plantas de cacao de tres meses (90 días) germinadas en sustratos; suelo 100 % y suelo 85 % + arena 15 %, una producción de 12.60 y 12.10 hojas.

Tabla 4. Medias para la variable índice de Dickson de acuerdo con la prueba de Tukey.
Table 4. Means for the Dickson index variable according to Tukey's test.

Sustrato	Tipo de fertilización	Media
Espuma Ultrafoam	Granular	0.648a
Convencional	Drench	0.602ab
Espuma Ultrafoam	Drench	0.500b
Convencional	Granular	0.487b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Materia seca de la planta (MSP)

Las plántulas de cacao cultivadas en sustratos a base de suelo, mezclado en alguna proporción con compuestos orgánicos, han arrojado excelentes resultados. García (2014) encontró que, tanto a los tres como a los seis meses en fase de vivero, el desarrollo en altura de la planta, diámetro a la base, número de hojas, área foliar, peso seco de raíz y peso de la materia seca total, era superior en comparación con las plántulas de cacao cultivadas en otros sustratos a base de residuos orgánicos. Similares resultados encontraron Quaye *et al.* (2019) al evaluar el efecto de diferentes medios de propagación; el sustrato suelo mostró los mejores resultados en cuanto a la altura y diámetro de la planta. Si bien, en este estudio el peso seco de la planta mostró diferencias significativas a favor del sustrato a base de suelo y cascarilla de arroz, al ver el efecto de la interacción de los sustratos con el tipo de fertilización en el periodo 90 d, el sustrato espuma agrícola con fertilización granular igualó los resultados del sustrato convencional, siendo estos dos significativamente superiores a los demás tratamientos (Tabla 3).

Índice de calidad de Dickson (ICD)

El índice de calidad de Dickson es un indicador para evaluar la calidad de las plántulas en función de atributos morfológicos como la materia seca, relación la altura y diámetro en la base del tallo, la materia seca del tallo y las hojas y la materia seca de la raíz (Rueda *et al*., 2012). Se considera que este índice es uno de los mejores parámetros para indicar la calidad de una planta en fase de vivero, ya que expresa el equilibrio en la distribución de la biomasa y la robustez, lo que sugiere una selección adecuada de plantas donde se descarte individuos desproporcionados, algunos de ellos de menor altura aun cuando tengan mayor vigor (González, 2007). Aunque no se encuentra referencia del uso de este índice en evaluación de plántulas de cacao en vivero, si se ha utilizado para predecir el comportamiento y desarrollo de plántulas de especies forestales (González *et al*., 1996); lo que permite sugerir que es válido tenerlo en cuenta como un parámetro más de medición de la calidad de las plantas de cacao en esta fase de desarrollo.

El análisis de varianza para el ICD se realizó solo a los 90 d y no se encontró diferencias estadísticas significativas para los contenedores y tipos de fertilización de manera independiente; no obstante, si las hubo para la interacción (p = 0.0011). El estudio mostró que la mejor proporcionalidad en las plantas de cacao se halló con los tratamientos espuma con fertilización granular y contenedor convencional con la fertilización tipo drench. Entre estos dos tratamientos no hubo diferencias estadísticas significativas; sin embargo, fueron superiores con relación a los dos tratamientos restantes (Tabla 4).

CONCLUSIONES

El desarrollo de las plantas de cacao en fase de vivero está determinado por la relación sustrato, fertilización y tiempo; algo que tienen muy bien definido los viveristas del sector cacaotero y que fue corroborado en este estudio. Mediante la utilización de bolsas y sustratos en un determinado tiempo logran producir plántulas de calidad. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que al cambiar la bolsa y el sustrato por el uso de las espumas agrícolas, manteniendo el protocolo de fertilización granular, se logra producir plántulas con iguales atributos morfológicos. En este sentido, las espumas agrícolas son una tecnología viable desde el punto de vista técnico; el cual pudiera reemplazar el uso de sustratos convencionales a base de suelo y material orgánico. Nuevas tecnologías que eviten el uso de plásticos contribuyen a la reducción de la contaminación ambiental, aportando así a la sostenibilidad de los diferentes sectores productivos.

Finalmente, es importante tener en cuenta la relación costo beneficio en el uso de una nueva tecnología, materia prima o producto. En este sentido, se recomienda validar una fase de producción a escala, considerando las implicaciones económicas que podría tener el uso de las espumas agrícolas u otras similares que estén disponibles en el mercado. Aspectos como la posible reducción del costo en transporte

de material vegetal de cacao desde el vivero hasta el sitio definitivo; la mano de obra por manipulación de las plantas en campo y el uso de agua en vivero, son algunos ejemplos de los beneficios económicos que traería el uso de estas tecnologías.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan especial agradecimiento a la Compañia Nacional de Chocolates, vivero para la paz al proporcionar recursos logísticos y su personal técnico Alexander Jaimes Rangel y Meiber Eduardo Arcila. Igualmente que a la empresa FENOCOL, al proporcionar las espumas ULTRAFOAM® usada para la investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abbott, P. C., Benjamin, T. J., Burniske, G. R., Croft, M. M., Fenton, M. C., Kelly, C., Lundy, M., Rodríguez-Camayo, F., y Wilcox, M. 2017. Un análisis de la cadena productiva del cacao en Colombia [An analysis of the cocoa production chain in Colombia (p. 86). USAID Colombia.

Ahmed, J., Tiwari, B. K., Imam, S. H., y Rao, M. A. 2012. Starch-based polymeric materials and nanocomposites: Chemistry, processing, and applications. Starch-Based Polymeric Materials and Nanocomposites: Chemistry, Processing, and Applications (pp. 1-396). CRC Press. doi:10.1201/b11848

AGRONET (Red de información y comunicación del sector agropecuario colombiano). 2021. Evaluaciones Agropecuarias Municipales. https://agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=3

Aguirre-Medina, JF., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J.y Avendaño-Arrazate, CH. 2007. Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner y Glomus intraradices Schenk et Smith. Interciencia, 32(8), 541-546

Amaraweera, S. M., Gunathilake, C., Gunawardene, O. H. P., Fernando, N. M. L., Wanninayaka, D. B., Dassanayake, R. S., Manipura, A. 2021. Development of starch-based materials using current modification techniques and their applications: A review. Molecules. MDPI. doi:10.3390/molecules26226880

Angulo,C., Mathios, M., Racchumi, A., Bardales, R. y Ayala,D. 2021. Growing of cacao seedlings (*Theobroma cacao* L.) in the nursery, using different volumes of substrate. Manglar 18(3): 261-266.

Aracelly-López, D., Plaza-Avellán, LF., Rivadeneira-Moreira, B., Párraga-Palacios, FM. y Herrera-Suárez, M. 2020. Comparison of three variants of substrate preparation used in the propagation of cocoa standards. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, 29(3), 37-49.

Bayala, J., Dianda, M., Wilson, J., Ouédraogo, S.J. y Sanon, K. 2009. Predicting field performance of five irrigated tree species using seedling quality assessment in Burkina Faso, West Africa. New Forests, 38. 309-322. doi: 10.1007/s11056-009-9149-4

Binotto, A.F., Lúcio, A.D., y Lopes, S.J. 2010. Correlations between growth variables and the Dickson quality index in forest seedlings. Cerne, Lavras, v. 16, n. 4, p. 457-464

Brucker Kelling, M., Machado Araujo, M., Benítez León, E., Carpenedo Aimi, S., y Turchetto, F. 2017. Regímenes de riego y dosis de polímero hidroretenedor sobre características morfológicas y fisiológicas de plantas de Cordia trichotoma. Bosque (Valdivia), 38(1), 123-131.

Castro-Garibay, S.L., Aldrete, A., López-Upton, J., y Ordáz-Chaparro, V.M. 2018. Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de pinus greggii var. australis en vivero. Agrociencia, 52(1), 115-127.

Cruz-Crespo, E., Can-Chulim, Álvaro, Chan-Cupul, W., Luna-Esquivel, G., Rojas-Velázquez, Ángel N., y Macilla-Villa, O.R. 2023. Cascarilla de arroz fragmentada como componente del medio de crecimiento de plántulas de albahaca: Cascarilla de arroz en crecimiento de albahaca. Biotecnia, 25(2), 52–59. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i2.1735

FEDECACAO. 2022. La produccion cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo record histórico. https://www.fedecacao.com.co/post/la-producci%C3%B3n-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-r%C3%A9cord-hist%C3%B3rico

Garate, M.A., Urrelo, J.L., y Delgado, H. 2020. Técnicas de propagación de cacao (*Theobroma cacao* L.) Proyecto Ampliación y Mejoramiento de los Servicios de Apoyo al Desarrollo Productivo de la Cadena del Cacao a los Productores en la Región de San Martín. 11 p.

García, G. 2014. Growth of cocoa seedlings as affected by different growth media and different polybag sizes. A thesis submitted to the University of Ghana, Legon in Partial fulfillment of the requirements for the award of Mphil (Crop Science) Degree.

Gobierno de la República de Colombia. 2021. Plan Nacional para la gestión sostenible de plásticos de un solo uso. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Bogotá D.C., Colombia. 31 p.

Gutiérrez, M., Gómez, R., y Rodríguez, N.F. 2011.Comportamiento del crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero, sembradas en diferentes volúmenes de sustrato. Ciencia y tecnología agropecuaria, 12(1), 33-41.

Holdridge, L.R. 1967. Life zone ecology. Life zone ecology. (rev. ed.).

IDEAM, 2019. Datos agroclimaticos de la estación C.I Motilonia-Agrosavia.

Landis, T.D., Dumroese, R.K. y Haase, D.L. 2010. The Container tree nursery manual. Vol. 7. Seedling processing, storage, and outplanting Agricultural Handbook 674. U. S. Department of Agriculture Forest Service. Washington, DC. USA. 200 p. https://rngr.net/publications/ctnm/volume-7

LLiuya Potokar, V. 2015. Fertilización orgánica en el crecimiento vegetativo de los patrones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un suelo inceptisols en fase de vivero, en el distrito de Nuevo Progreso, Tocache, San Martín.

López-Arias, C.A., Escalante Estrada, J.A.S., Rodríguez-González, M.T., y Aguilar Carpio, C. 2023. Crecimiento, biomasa, rendimiento y componentes de canola (Brassica napus L.) en respuesta a la fuente nitrogenada: Crecimiento, biomasa, rendimiento y componentes de canola. Biotecnia, 25(3), 65 – 70. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.2003

Luna, T., Landis, T., y Dumroese, K. 2012. Contenedores: Aspectos técnicos, biológicos y económicos. En Consejo Federal de Inversiones et al (Eds). Producción de Plantas en Viveros Forestales. 7 p. https://www.researchgate.net/publication/272790749_Contenedores_aspectos_tecnicos_biologicos_y_economicos

Luna, C.V. 2019. Substrate and fertilizer concentration on loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in nursery growth. Rev. Agron. Noroeste Argent. 39 (1): 19-29.

Mexal, J.G., y Landis, T.D. 1990. Target seedling concepts: height and diameter. In Proceedings, western Forest nursery association (pp. 13-17).

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. 2021. Plan Nacional para la gestión sostenible de plásticos de un solo uso: sustitución de materiales plasticos, prevención, reducción, reutilización, reciclaje, aprovechamiento, comunicación y cultura ciudadana ecodiseño, consumo responsable, responsabilidad extendida del productor, economía circular, ciclo de vida de materiales. Mesa nacional para la gestión sostenible del plástico. Bogotá D.C. 32 p

Muñoz Flores, H.J., Sáenz Reyes, J.T., Coria Avalos, V.M., García Magaña, J.deJ., Hernández Ramos, J., y Manzanilla Quijada, G.E. 2015. Calidad de planta en el vivero forestal La Dieta, Municipio Zitácuro, Michoacán. Revista mexicana de ciencias forestales. 6(27), 72-89.

Osorio, M., Leiva, E., Ramírez, R. 2017. Crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes tamaños de contenedor. Rev. Cienc. Agr. 34(2): 73 - 82. http://www.scielo.org.co/pdf/rcia/v34n2/v34n2a06.pdf

Pabón, M., Herrera, L. y Sepúlveda, W. 2016. Caracterización socio-económica y productiva del cultivo de cacao en el departamento de Santander (Colombia). Revista Mexicana de Agronegocios, 38, 283-294. https://www.redalyc.org/journal/141/14146082001/html/

Parra Terraza, S., Lara Murrieta, P., Villarreal Romero, M., y Hernández Verdugo, S. 2012. Crecimiento de plantas y rendimiento de tomate en diversas relaciones nitrato/amonio y concentraciones de bicarbonato. Revista fitotecnia mexicana, 35(2), 143-153.

Quaye, A.K., Kolan, S., Arthur, A., Pobee, P., Dogbatse, J.A. 2019. Effect of media type and compost mixtures on nutrient uptake and growth of cocoa (*Theobroma cacao* L.*)* seedling in the nursery. Ghana Journal of Horticulture. Vol. 14, No. 1. pp. 11-21

Ramírez, R. 2016. Fertilidad integral del suelo. Actualización en fertilidad del suelo, 41-56.

Sáenz Reyes, J.T., Muñoz Flores, H.J., Pérez D., C.M.Á., Rueda Sánchez, A., y Hernández Ramos, J. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 5(26),98-111.

Ríos, F., Rehpani, C., Ruiz, A., y Lecaro, J. 2017. Estrategias país para la oferta de cacaos especiales - Políticas e iniciativas privadas exitosas en el Perú, Ecuador, Colombia y República Dominicana (p. 136). Swisscontact Colombia Foundation.

Rueda, A., Benavides, J.D., Prieto-Ruiz, J., Sáenz, J.T., Orozco-Gutiérrez, G., y Molina, A. 2012. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Jalisco. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 3(14):69-82.

Salto, C.S., García, M.A., y Harrand, L. 2013. Influencia de diferentes sustratos y contenedores sobre variables morfológicas de plantines de dos especies de *Prosopis*. Quebracho - Revista de Ciencias Forestales, 21(1-2),90-102.

Santiago Trinidad, O., Vargas Hernández, J.deJ., Aldrete, A., López Upton, J., y Fierros González, A.M. 2015. Sustratos y tamaños de contenedor en el desarrollo de *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. en vivero. Revista mexicana de ciencias forestales, 6(31), 94-113.

SAS Institute. 2013. Base SAS® 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures. Second edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 550 p.

Sodré, G.A., y Gomes, A.R.S. 2019. Cocoa propagation, technologies for production of seedlings. Revista Brasileira De Fruticultura, 41 (2), e–782. doi:10.1590/0100-2945201978

Vargas, H., Santa Cruz, F., y Lizárraga, A. 2020. Efecto de tamaño de envases y tres tipos de sustratos para la obtención de portainjerto de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero. Manglar.

Villacorta, C.D.A., Flores, M.A.M., García, A.R., Bardales-Lozano, R.M., y Montejo, D.A. 2021. Crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero, usando diferentes volúmenes de sustrato. Manglar, 18(3), 261-266.

Villalón, H., Ramos, J., Vega, J., Marino, B., Muños, M., Garza, F. 2016. Indicadores de calidad de la planta de *Quercus canby* Trel. (encino) en vivero forestal. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 12 (1): 46-52.

Wickramasuriya, A.M., y Dunwell, J.M. 2018. Cacao biotechnology: current status and future prospects. Plant Biotechnol J, 16: 4-17. doi: 10.1111/pbi.12848

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Aplicación foliar suplementaria de Boro, Manganeso y Molibdeno como inductores de crecimiento, rendimiento y concentración de fitoquímicos en el cultivo de tomate

Supplementary foliar application of Boron, Manganese and Molybdenum as inducers of growth, yield and phytochemicals concentration in tomato crops

Mariana Isabel García-Terrazas[1]✉, Adalberto Benavides-Mendoza[2]✉, Susana González-Morales[3]✉, Julia Medrano-Macías[2]✉ and Marcelino Cabrera-De La Fuente[2]*✉

[1] Estudiante de Postgrado. Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 23315, Coahuila, México.
[2] Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 23315, Coahuila, México.
[3] Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo 23315, Coahuila, México.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of supplementary foliar application of liquid commercial products of B^{+3} (Basfoliar® with 13 % B), Mn^{+2} (CRECITEC Mn® with 5 % Mn) and Mo^{+6} (MOLIBION® with 9.2 % Mo) on tomato yield and phytochemicals. The treatments were: B^{+3} (1 mL L^{-1}), Mn^{+2} (2 mL L^{-1}), Mo^{+6} (1.5 mL L^{-1}), their interactions (B^{+3}+Mn^{+2}, B^{+3}+Mo^{+6}, Mn^{+2}+Mo^{+6}, and B^{+3}+Mn^{+2}+Mo^{+6}) and a control, applied every 15 days after transplantation. A randomized complete block design with eight treatments and 10 repetitions was used. The application of the microelements did not modify the yield. For plant height all treatments exceeded the control except for B^{+3} and Mn^{+2}. The Mo^{+6} treatment increased the dry biomass. In fruit, Mn increased proteins, B^{+3}+Mo^{+6} and Mn^{+2}+Mo^{+6} decreased phenols, B^{+3}, Mo^{+2} and Mn^{+2}+Mo^{+6} increased flavonoids, and B^{+3}+Mn^{+2} and Mn^{+2}+Mo^{+6} decreased glutathione. B^{+3}+Mo^{+6} increased lycopene, but decreased β-carotene. Regarding lipophilic antioxidant capacity of the fruit, it was increased by B^{+3}+Mn^{+2} and decreased by B^{+3}+Mo^{+6}. This study shows that the supplementary application of these microelements is an alternative to increase phytochemicals in crops, without affecting yields.
Keywords: nutrition; micronutrients; yield, growth; phytochemicals.

RESUMEN

En el estudio se evaluó la aplicación foliar suplementaria de productos comerciales líquidos de B^{+3} (Basfoliar® con 13 % de B), Mn^{+2} (CRECITEC Mn® con 5 % de Mn) y Mo^{+6} (MOLIBION® con 9.2 % de Mo) sobre el rendimiento y fitoquímicos de tomate. Los tratamientos fueron: B^{+3} (1 mL L^{-1}), Mn^{+2} (2 mL L^{-1}), Mo^{+6} (1.5 mL L^{-1}), sus interacciones (B^{+3}+Mn^{+2}, B^{+3}+Mo^{+6}, Mn^{+2}+Mo^{+6} y B^{+3}+Mn^{+2}+Mo^{+6}) y un testigo cada 15 d después del trasplante. Se utilizo un diseño de bloques completos al azar con ocho tratamientos y 10 repeticiones. Los tratamientos no modificaron el rendimiento, sin embargo, B^{+3}+Mo^{+6} mejoró el diametro ecuatorial del fruto. Para altura de planta los tratamientos superaron al control a excepción de B^{+3} y Mn^{+2}, y el número de hojas se incrementó con Mn^{+2} y Mo^{+6}. El tratamiento de Mo^{+6} aumentó el peso seco total. En fruto, Mn incrementó las proteínas, B^{+3}+Mo^{+6} y Mn^{+2} +Mo^{+6} disminuyeron los fenoles, B^{+3}, Mo^{+6} y Mn^{+2}+Mo^{+6} aumentaron los flavonoides y B^{+3}+Mn^{+6} y Mn^{+3}+Mo^{+6} disminuyeron el glutatión. B^{+3}+Mo^{+6} incrementó licopeno, pero disminuyó el β-caroteno. Para capacidad antioxidante lipofílica, B^{+3}+Mn^{+2} la incrementó y B^{+3}+Mo^{+6} la disminuyó. La aplicación suplementaria de estos microelementos es adecuada para incrementar fitoquímicos en cultivos, sin afectar rendimientos.
Palabras clave: nutrición; micronutrientes; rendimiento; crecimiento; fitoquímicos.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el segundo cultivo de mayor importancia es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), siendo sus frutos una fuente de fitoquímicos como; carotenoides, vitaminas y fenoles que benefician la salud humana, aunado a que es considerado como un fruto objetivo para realizar investigaciones con el fin de optimizar sus propiedades alimenticias (FAO, 2013). Es bien sabido que el consumo en fresco y de productos derivados de esta hortaliza es seguro y destacan por tener un alto valor nutricional, sobresaliendo sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Salehi *et al*., 2019). Desafortunadamente el estrés afecta el crecimiento, rendimiento y calidad del cultivo (Bai *et al*., 2018).

Se ha demostrado que la aplicación foliar suplementaria de microelementos es una alternativa prometedora, ya que incrementan el rendimiento de los cultivos, fungen como cofactores de enzimas y son imprescindibles en diferentes rutas metabólicas (Wenda-Piesik *et al*., 2017). Dentro de los microelementos estan el boro (B), manganeso (Mn) y molibdeno (Mo).

El B, participa en el metabolismo de los glúcidos y en procesos encargados de la división celular (Gupta y Solanki, 2013), aunado a que mejora el cuajado de frutos (Gutiérrez-Gamboa *et al*., 2018). Islam *et al*. (2018) mencionan que con la aplicación foliar de H_3BO_3 al 4.85 mM se incrementó la firmeza y la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico en frutos

*Autor para correspondencia: M. Cabrera-De La Fuente
Correo-e: cafum7@yahoo.com.mx
Recibido: : 31 de mayo de 2023
Aceptado:: 9 de abril de 2024
Publicado: xx de abril de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2052

de tomate cherry. El Mn, se desempeña como como activador y cofactor de enzimas, además ejerce un papel importante en la fotosíntesis (Schmidt y Husted, 2019). Hamouda *et al*. (2016) indican que con la aplicación foliar de $MnSO_4$ (1600 mg L^{-1}) en granado se incrementó el rendimiento, azucares, antocianinas y ácido ascórbico de la fruta. El Mo es cofactor de la enzima nitrato reductasa, la cual está involucrada en la asimilación del nitrógeno (N) (Rana *et al*., 2020), además, forma parte de la nitrogensa más estudiada; la molibdeno-dependiente, la cuál lleva a cabo la fijación biológica del N (Westermann, 2005). Ghafarian *et al*. (2013) aplicaron Mo en trigo bajo estrés por sequía e, indican que la aplicación al 1 % de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ aumento el peso del grano, la longitud del pedúnculo y el número de grano por espiga.

En este contexto, la fertilización foliar suplementaria es una técnica que se está utilizando para mejorar características agronómicas y de calidad de los cultivos, ya que se basa en hacer aplicaciones en sistemas donde no existen deficiencias nutrimentales, lo cual se cree que genera un ligero estrés en las plantas que promueve la síntesis de antioxidantes como medida de defensa (Rodrigues *et al*., 2021). Aunado a esto, dichos elementos (B, Mn y Mo) están involucrados en procesos para llevar a cabo la fotosíntesis, proceso mediante el cual, se sintetizan los carbohidratos y, estos a su vez, son precursores de fitoquímicos (ácido ascórbico, fenoles, flavonoides, etc.) (Kollist *et al*., 2019). Esto indica que dichos elementos están involucrados directa o indirectamente en la acumulación de fitoquímicos. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la aplicación foliar suplementaria de productos comerciales de B, Mn y Mo como inductores de crecimiento, rendimiento y fitoquímicos en tomate

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de trabajo

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de mediana tecnología, ubicado en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate saladette de crecimiento indeterminado del hibrido el CID F1 de la casa comercial Harris Moran Seed Company, Modesto, CA, USA. Se sembraron en charolas de poliestireno con una combinación de peat moss y perlita (70:30 v/v). Las plántulas se mantuvieron en charolas por 30 días, para después trasplantarlas en bolsasde poliestireno negro con capacidad de 10 L con la misma relación de sustrato utilizada para la germinación de las semillas. Para la nutrición del cultivo se utilizó la solución nutritiva Steiner (1961), la cual se aplicó en diferentes concentraciones para proporcionar los nutrientes necesarios al cultivo de acuerdo con su etapa fenológica. Se aplicó al 25 % al inicio del crecimiento vegetativo, al 50 % en el crecimiento vegetativo pleno, al 75 % en la floración y crecimiento de los frutos y al 100 % en el llenado de frutos y cosecha.

Tratamientos

En el experimento se evalúo el efecto de la aplicación foliar de B, Mn, Mo, sus interacciones y un control. Se utilizaron tres productos comerciales en forma líquida, donde el producto Basfoliar® contenía 13 % de B, el CRECITEC Mn® 5 % de Mn y el MOLIBION® 9.2 % de Mo. Los tratamientos se aplicaron en intervalos de 15 días después del trasplante, por medio de aplicación foliar a punto de goteo, con un aspersor manual, dando un total de seis aplicaciones, siendo la última a los 90 días después del trasplante (ddt) (Tabla 1).

Variables evaluadas

Se midió el rendimiento de frutos (de los 70 a los 120 ddt), para ello se cosecho hasta el quinto racimo, manejando cinco frutos por racimo. También se evaluó el diámetro polar y ecuatorial de los frutos (se evaluaron dos frutos por racimo de los 70 a los 120 ddt). La altura de planta, diámetro de tallo y número de hojas se evaluaron al final de la prueba que fue a los 120 ddt. Se midió la acumulación de biomasa seca del vástago y raíz al final de la prueba, para ello se cortaron las plantas desde la base del tallo para separar las partes a evaluar y posteriormente secar el material en un horno a 70 °C durante 72 h. Se cuantificaron proteínas y fitoquímicos del fruto. Para estos análisis, los frutos fueron congelados y liofilizados. Para las variables relacionadas con parámetros agronómicos y bioquímicos se utilizaron cinco y cuatro réplicas, respectivamente por tratamiento.

Proteínas y fitoquímicos del fruto

El muestreo de frutos para la cuantificación de fitoquímicos se tomó del segundo racimo (91 ddt). Los frutos se muestrearon cuando alcanzaron un color rojo intenso. Las proteínas se determinaron con la metodología descrita por Bradford

Tabla 1. Tratamientos aplicados.
Table 1. Applied treatments.

Tratamiento	Descripción
TC	Agua destilada
T1	B (1 mL L^{-1})
T2	Mn (2 mL L^{-1})
T3	Mo (1.5 mL L^{-1})
T4	B+Mn
T5	B+Mo
T6	Mn+Mo
T7	B+Mn+Mo

Las dosis aplicadas fueron con base en las especificaciones de uso de los productos. TC: Tratamiento control.
The doses applied were based on the specifications for use of the products. TC: Control treatment.

(1976) utilizando el azul de Coomassie como agente de reacción. Los fenoles totales se determinaron de acuerdo con la metodología de Singleton *et al*. (1999) utilizando el reactivo Folin Ciocalteu al 100 %. Los flavonoides se cuantificaron siguiendo la metodología de Zhishen *et al*. (1999) mediante la técnica del cloruro de aluminio. El Glutatión se cuantificó siguiendo la metodología de Xue *et al*. (2001), mediante la reacción del ácido 5,5 ditio-bis-2 nitro benzoico. El licopeno y β-caroteno se determinaron de acuerdo con Nagata y Yamashita (1992). La capacidad antioxidante lipofílica DPPH se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Brand-Williams *et al*. (1995). Para estos análisis se utilizó un espectrofotómetro Uv-Vis (Genesis 10s Uv-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizo un diseño de bloques completos al azar, que contó con ocho tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 80 unidades experimentales. Se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT 2020, donde se realizó un ANOVA y una comparación de medias con LSD FISHER $p \leq 0.10$.

RESULTADOS

Rendimiento y tamaño de frutos

La aplicación de los tratamientos no mostró diferencias para rendimiento, diámetro polar y peso promedio de frutos, únicamente mostró resultados significativos para diámetro ecuatorial, siendo la interacción B+Mo la que superó en 5.8 % al control (Figura 1).

Variables de crecimiento

La aplicación de los tratamientos arrojó resultados significativos para las variables de: altura de planta y número de hojas (Figura 2). Respecto a la altura, los tratamientos Mo, B+Mn, B+Mo, Mn+Mo y B+Mn+Mo superaron al control en un 6.32, 7.33, 7.90, 5.43 y 7.07 %, respectivamente. Para número de hojas, se observa un incremento de 13.4 y 8.24 % con los tratamientos de Mn y Mo, respectivamente en comparación al control.

Producción de Biomasa seca

La aplicación de los tratamientos incrementó significativamente el peso seco de raíz y total (Figura 3). Para peso seco de la raíz los tratamientos Mo, B+Mn, B+Mo y Mn+Mo superaron al control en un 104.45, 47.86, 88.03 y 77.73 %, respectivamente. Para peso seco total el tratamiento de Mo superó al control en un 30.30 %.

Proteínas y fitoquímicos hidrofílicos

La aplicación de los tratamientos causó diferencias significativas sobre las proteínas, fenoles, flavonoides y GSH (Figura 4). De tal manera se aprecia, que el tratamiento de Mn superó

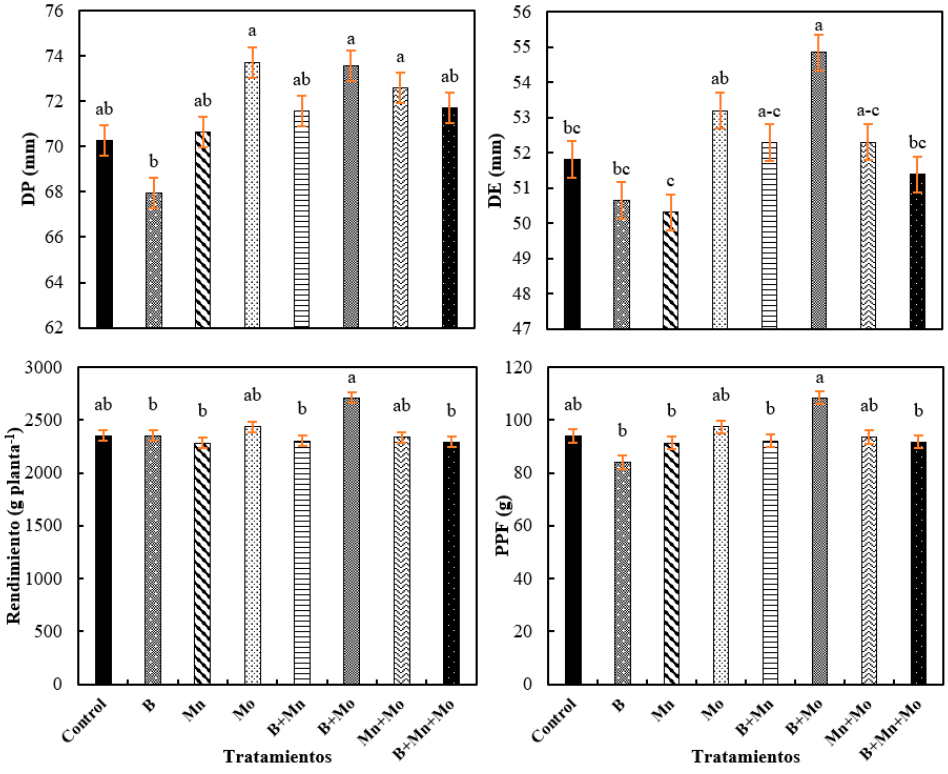


Figura 1. Diámetros y rendimiento por planta de los frutos de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.10$). DP: Diámetro polar; DE: Diámetro ecuatorial; PPF: Peso promedio de frutos. n = 5 ± error estándar.

Figure 1. Diameters and yield per tomato fruits plant. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.10$). DP: Polar diameter; DE: Equatorial diameter; PPF: Average fruit weight. n = 5 ± standard error.

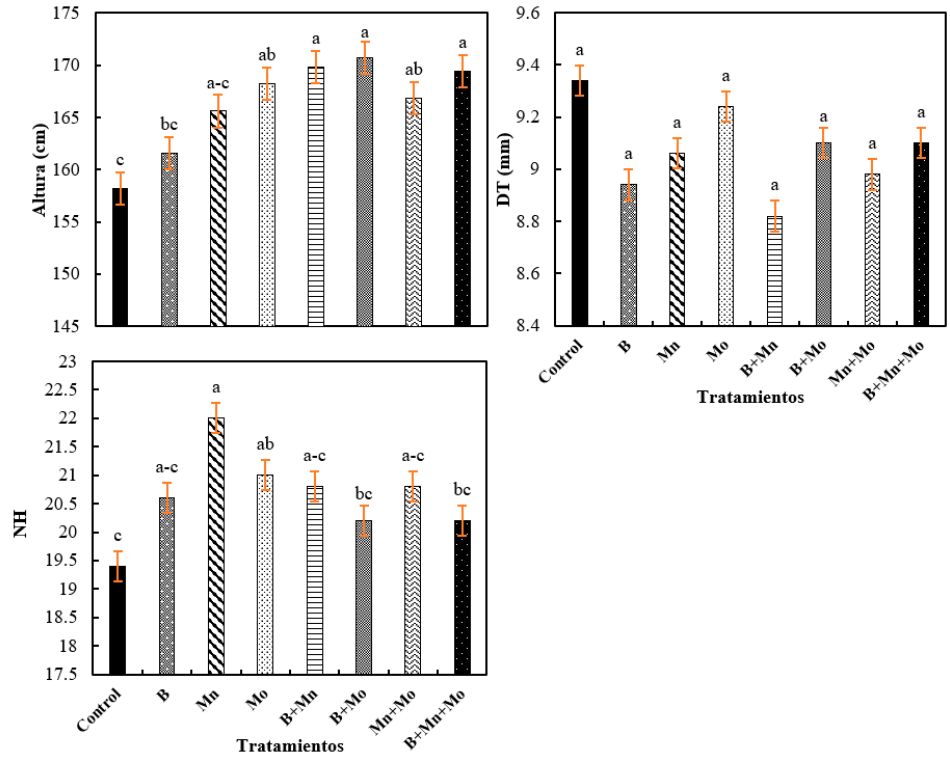


Figura 2. Variables de crecimiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.10$). DT: Diámetro de tallo; NH: Numero de hojas. n = 5 ± error estándar.
Figure 2. Growth variables. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.10$). DT: Stem diameter; NH: Number of leafs. n = 5 ± standard error.

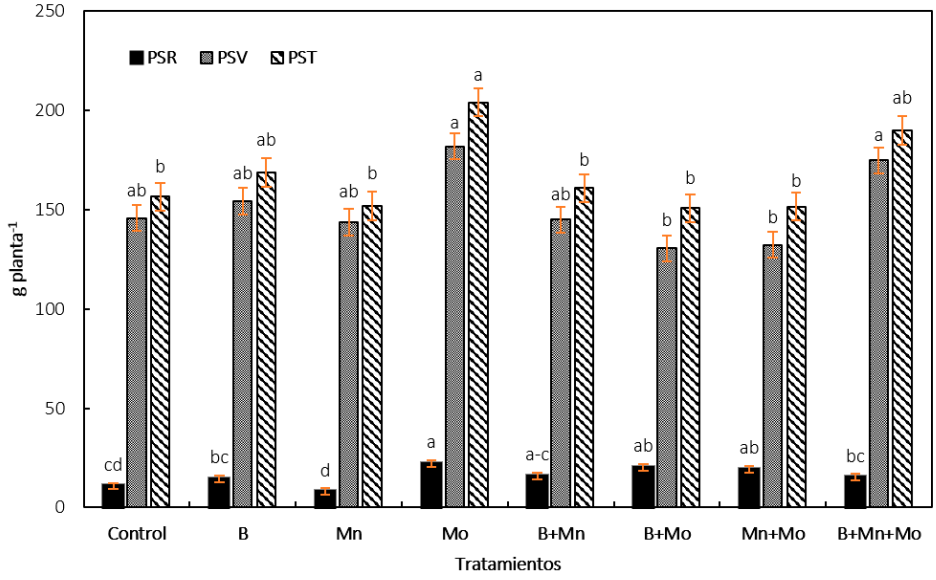


Figura 3. Producción de biomasa seca. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.10$). PSR: Peso seco de raíz; PSV: Peso seco de vástago; PST: Peso seco total. n = 5 ± error estándar.
Figure 3. Dry biomass production. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.10$). PSR: Dry root weight; PSV: Dry offshoot weight; PST: Total dry weight. n = 5 ± standard error.

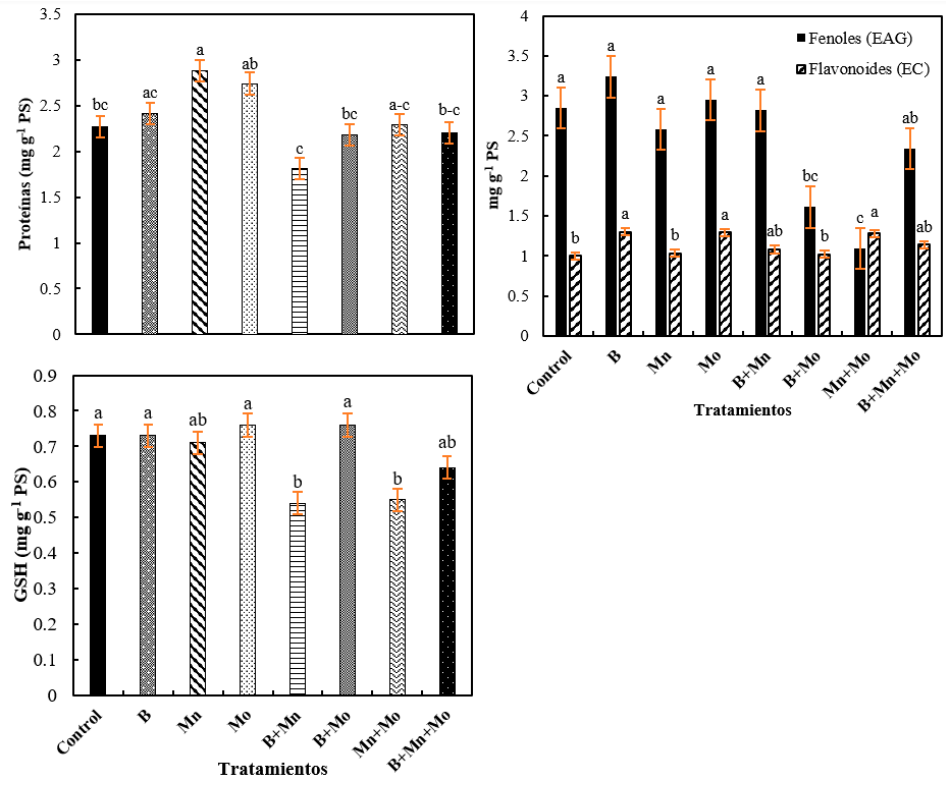


Figura 4. Proteínas y antioxidantes hidrofílicos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.10$). EAG: Equivalentes de ácido gálico; EC: Equivalentes de catequina; GSH: Glutatión reducido; PS: Peso seco. n = 4 ± error estándar.
Figure 4. Proteins and hydrophilic antioxidants. Different letters indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.10$). EAG: Gallic acid equivalents; EC: Catechin Equivalents; GSH: Reduced glutathione; PS: Dry weight. n = 4 ± standard error.

al control con un 26.8 %, respecto a la acumulación de proteínas totales. Para fenoles, B+Mo y Mn+Mo disminuyeron su concentración en comparación con el control en un 77.01 y 161.46 %, respectivamente, el resto de los tratamientos son iguales al control. Para flavonoides, B, Mo y Mn+Mo superaron al control en un 30, 29 y 28 %, respectivamente. Respecto a GSH, B+Mn y Mn+Mo disminuyeron su concentración en comparación con el control en un 35.18 y 32.72 %, respectivamente, el resto de los tratamientos son iguales al control.

Fitoquímicos lipofílicos y capacidad antioxidante

La aplicación de los tratamientos mostró diferencias significativas en cuanto al contenido de licopeno, β-caroteno y capacidad antioxidante lipofílica (Tabla 2). Los tratamientos B, Mo y B+Mo incrementaron la concentración de licopeno en comparación al control en un 12.15, 19.92 y 23.89 %, respectivamente. Respecto a la acumulación de β-caroteno, existió una disminución en su concentración con Mo y B+Mo de un 32.24 y 56.25 %, respectivamente en comparación con el control. Para capacidad antioxidante lipofílica, B+Mn la incrementó en un 122.49 %, en comparación con el control, sin embargo, B+Mo la disminuyó en un 144.81 %, en comparación con el control.

Tabla 2. Antioxidantes lipofílicos y capacidad antioxidante.
Table 2. Lipophilic antioxidants and antioxidant capacity.

Tratamiento	Licopeno (mg 100 g^{-1} PS)	β-Caroteno (mg 100 g^{-1} PS)	CAL DPPH (mg EβC g^{-1} PS)
Control	23.44 ± 1.9^{de}	13.00 ± 0.9^{ab}	23.38 ± 7.7^{bc}
B	26.29 ± 3.1^{bc}	10.99 ± 1.5^{bc}	26.56 ± 12.3^{b}
Mn	24.38 ± 0.4^{c-e}	14.39 ± 1.5^{a}	24.67 ± 17.4^{bc}
Mo	28.11 ± 1.4^{ab}	9.83 ± 1.2^{cd}	27.69 ± 9.5^{b}
B+Mn	25.63 ± 3.1^{cd}	13.32 ± 3.1^{ab}	52.02 ± 1.3^{a}
B+Mo	29.04 ± 2.9^{a}	8.32 ± 5.1^{d}	9.55 ± 0.7^{d}
Mn+Mo	22.43 ± 0.8^{e}	12.66 ± 2.2^{ab}	15.45 ± 4.5^{cd}
B+Mn+Mo	23.85 ± 1.2^{c-e}	14.19 ± 0.7^{a}	18.92 ± 4.0^{b-d}

Letras distintas dentro de cada columna representan diferencias significativas entre tratamientos (LSD, $p \leq 0.10$). CAL: Capacidad antioxidante lipofílica; EβC: Equivalentes de β-caroteno; PS: Peso seco. n = 4 ± error estándar.
Different letters within each column indicate significant differences between treatments (LSD, $p \leq 0.10$). CAL: Lipophilic antioxidant capacity; EβC.

DISCUSIÓN

Rendimiento, crecimiento y biomasa seca del cultivo de tomate

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el uso de los microelementos no causó efectos significativos para el rendimiento, diámetro polar de frutos, peso de frutos y diámetro de tallo, solo existieron diferencias para diámetro ecuatorial de frutos, altura de planta y número de hojas. Ali *et al*. (2015) en su estudio indican que la aplicación foliar de H_3BO_3 (25 mg L^{-1}) no causó cambios en el rendimiento de tomate, sin embargo, en combinación con $ZnSO_4$ lo aumentó (12.5 mg L^{-1}), lo mismo sucedió para altura de planta y número de hojas. Karim *et al*. (2012) reportan resultados similares a los del presente estudio para rendimiento con aplicaciones foliares de $Na_2B_4O_7$ (0.01 %), $MnSO_4$ (0.1 %) y $ZnSO_4$ (0.05 %) en el cultivo de trigo bajo condiciones óptimas de desarrollo, sin embargo, bajo estrés por sequía, la aplicación de los microelementos mejoró el rendimiento. Por otro lado, Steiner *et al*. (2018) indican que la aplicación foliar de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (55 a 62 g ha^{-1}) mejoró en lechuga el rendimiento y sus componentes, gracias a la mejora en la asimilación del N.

Los resultados de la aplicación foliar de microelementos estarán en función de las condiciones nutrimentales en las que se desarrollen los cultivos, en primer lugar, si están bajo deficiencias nutrimentales la aplicación foliar puede resultar benéfica en la mejora de ciertas características agronómicas de los cultivos y si la aplicación foliar es suplementaria (sin limitación de nutrientes) los resultados pueden ser positivos, negativos, nulos o mixtos (Rodrigues *et al*., 2021). En este sentido la aplicación fue suplementaria, por lo cual se explica que no se haya afectado el rendimiento del cultivo de tomate y sus componentes.

De forma general el B es un elemento involucrado en la sintesis de glucidos y en el cuajado de frutos, el Mn es activador de enzimas y está involucrado en el proceso fotosintético, y el Mo es cofactor de la enzima nitrato reductasa (Gupta y Solanki, 2013; Schmidt y Husted, 2019; Rana *et al*., 2020). Estos elementos aplicados de forma suplementaria, como ya se mencionó, pueden tener diferentes efectos a los observados cuando se aplican de acuerdo con las necesidades nutrimentales de los cultivos (Rodrigues *et al*., 2021). En este sentido se aplicaron las dosis recomendadas de los productos, y por lo tanto es una explicacion de que no se haya modificado el rendimiento. También es posible que al incrementar las dosis (dosis no recomendadas en los productos aplicados) se puedan incrementar o disminuir los rendimentos, lo cual también estará influenciado por las condiciones en las que se desarrolle el cultivo.

Proteínas totales y fitoquímicos

Los frutos de tomate son fuente de antioxidantes (compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y glicoalcaloides), los cuales tienen la capacidad de reducir moléculas oxidantes y que, a su vez, no solo son importantes para los procesos propios de las plantas, sino también, son importantes para la salud humana, gracias a que ayudan al combate y prevención de enfermedades crónicas degenerativas (Chaudhary *et al*., 2018). Para poder determinar el valor nutricional de los frutos de tomate, no solo se debe tomar en cuenta los metabolitos primarios (proteínas, lípidos y carbohidratos), sino también la acumulación de los metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, GSH, licopeno, β-caroteno) (Çolak *et al*., 2020).

El tratamiento con Mn aumentó la concentración de proteínas. Esto puede deberse al hecho de que el Mn está involucrado en la asimilación de N, el cual es el elemento predominante en la estructura de las proteínas (Alejandro *et al*., 2020). Además, es esencial para proteínas catalíticas (metaloenzimas) y el complejo proteico del fotosistema II, como lo indican Alejandro *et al*. (2020).

Se observaron cambios favorables para flavonoides, licopeno y capacidad antioxidante lipofílica, lo que indica que la aplicación de microelementos activa el sistema antioxidante, ya que al realizar aplicaciones suplementarias se genera un ligero estrés que activa el sistema antioxidante, esto para detoxificar a las células de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rodrigues *et al*., 2021). Resultados similares son reportados por Islam *et al*. (2018) quienes indican que la aplicación foliar de H_3BO_3 (4.85 mM) incrementó la concentración de ácido cítrico y ascórbico en frutos de tomate cherry. De la misma manera Hamouda *et al*. (2016) mencionan que la aplicación foliar de $MnSO_4$ (1600 mg L^{-1}) incrementó las antocianinas y ácido ascórbico en frutos de granado. Sutulienė *et al*. (2022) aplicaron B (12.5 mg L^{-1}) y Mo (100 mg L^{-1}) en guisante y, sus resultados muestran que el Mo aumentó los fenoles y capacidad antioxidante, mientras que B disminuyó dichas variables.

En el experimento se observó una disminución de fenoles por efecto de B+Mo y Mn+Mo, de GSH con B+Mn y Mn+Mo y de β-caroteno y capacidad antioxidante lipofílica con B+Mo. Esto nos indica que el uso combinado de estos micronutrientes causó un efecto antagónico, por lo cual no se recomienda su combinación en caso de querer mejorar dichas variables. Estos resultados son similares a los reportados por Sutulienė et al. (2022) descritos anteriormente.

Los tratamientos que mostraron incrementos de fitoquímicos se deben posiblemente a que los micronutrientes actuaron como inductores del sistema antioxidante, ya que, el aplicarlos de forma suplementaria, provocaron un estrés que se tradujo en el incremento de moléculas antioxidantes como medida de defensa (Kollist *et al*., 2019).

El B, Mn y Mo son elementos que tienen una relación en el proceso fotosintético (Priadkina, 2020). El B está involucrado en la síntesis de glúcidos, el Mn en la síntesis de clorofila y, el Mo es cofactor de la enzima nitrato reductasa, es imprescindible para la asimilación de N, el cual está involucrado en la capacidad fotosintética de las hojas, ya que las proteínas de los tilacoides y las presentes en el ciclo de Calvin constituyen la mayor parte del N foliar, lo cual nos indica que los tres están involucrados en la producción de fotoasimilados (Gupta y Solanki, 2013; Sánchez *et al*., 2018). Estos fotoasimilados como la glucosa son metabolitos primarios precursores de metabolitos secundarios con poder

antioxidante (Sarmadi *et al*., 2018). La glucosa por reacciones enzimáticas puede convertirse en ácido ascórbico, aunado a esto, el fosfoenolpiruvato, un intermediario de la glucólisis es precursor de compuestos fenólicos (Lynch y Dudareva, 2020). Esto nos habla de que estos microelementos están involucrados directa e indirectamente en el sistema antioxidante de las plantas.

CONCLUSIONES

En la investigación se reforzó la importancia de la aplicación foliar suplementaria con microelementos, comprobando que tanto en su forma individual, como en interacción con otros elementos mejoraron algunas variables agronómicas como diámetro ecuatorial de frutos con B+Mo, altura de planta con B+Mo, número de hojas con Mn y el peso seco total con Mo. En cuanto a las variables fitoquímicas, algunas se mejoraron (proteínas con Mn, flavonoides con B y licopeno con B+Mo) y otras disminuyeron (Fenoles con B+Mo y Mn+Mo, GSH con B+Mn y Mn+Mo y β-caroteno con Mo y B+Mo). Existen pocas investigaciones sobre la aplicación de elementos en condiciones sin limitación de nutrientes, por lo cual se requieren más estudios en diferentes cultivos y con diferentes formas de aplicación.

Cuando se tienen niveles optimos de nutrientes en la solución que se aplica, son los que el cutlivo demanda con base a metas de rendimiento, para nuestro caso, la aplicación suplementaria y vía foliar fue para identificar los cambios en el crecimiento, desarrollo y calidad nutracéutica del tomate, es decir fue un plus en la aplicación de estos microelementos vía riego.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al CONAHCyT por la beca otorgada de posgrado.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

Alejandro, S., Höller, S., Meier, B. y Peiter, E. 2020. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. Frontiers in Plant Science. 11: 300. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300

Ali, M.R., Mehraj, H. y Jamal Uddin, A.F.M. 2015. Effects of foliar application of zinc and boron on growth and yield of summer tomato. Journal of Bioscience and Agriculture Research. 6: 512-517. https://doi.org/10.18801/jbar.060115.61

Bai, Y., Sunarti, S., Kissoudis, C., Visser, R.G. y Van der Linden, C. 2018. The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. Frontiers in Plant Science. 9: 801. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00801

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/j.cj.2017.04.003

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C.L.W.T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 28: 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B. y Nagpal, A.K. 2018. Bioactivities of phytochemicals present in tomato. Journal of Food Science and Technology. 55: 2833-2849. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z

Çolak, N.G., Eken, N.T., Ülger, M., Frary, A. y Doğanlar, S. 2020. Mapping of quantitative trait loci for antioxidant molecules in tomato fruit: Carotenoids, vitamins C and E, glutathione and phenolic acids. Plant Science. 292: 110393. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110393

Ghafarian, A.H., Zarghami, R., Zand, B. y Bayat, V. 2013. Wheat performance as affected by foliar application of molybdenum (Mo) under drought stress condition. International Journal of Agronomy and Plant Production. 4: 3050-3056.

Giménez, G., Andriolo, J. L., Janisch, D. y Godoi, R. 2008. Closed soilless growing system for producing strawberry bare root transplants and runner tips. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 43: 1757-1761.

Gupta, U. y Solanki, H. 2013. Impact of boron deficiency on plant growth. International Journal of Bioassays. 2: 1048-1050.

Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Souza-Da Costa, B. y Moreno-Simunovic, Y. 2018. Strategies for the improvement of fruit set in *Vitis vinifera* L. cv. 'Carménère' through different foliar biostimulants in two different locations. Ciência e Técnica Vitivinícola. 33: 177-183. https://doi.org/10.1051/ctv/20183302177

Hamouda, H.A., Khalifa, R.K.M., El-Dahshouri, M.F. y Zahran, N.G. 2016. Yield, fruit quality and nutrients content of pomegranate leaves and fruit as influenced by iron, manganese and zinc foliar spray. International Journal of Pharm Tech Research. 9: 46-57.

Islam, M.Z., Mele, M.A., Ki-Young, C.H.O.I. y Ho-Min, K.A.N.G. 2018. The effect of silicon and boron foliar application on the quality and shelf life of cherry tomatoes. Zemdirbyste-Agriculture. 105: 159-164. https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.020

Karim, M.R., Zhang, Y.Q., Zhao, R.R., Chen, X.P., Zhang, F.S. y Zou, C.Q. 2012. Alleviation of drought stress in winter wheat by late foliar application of zinc, boron, and manganese. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 175: 142-151. https://doi.org/10.1002/jpln.201100141

Kollist, H., Zandalinas, S.I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjärvi, J. y Mittler, R. 2019. Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. Trends in Plant Science. 24: 25-37. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.003

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R. y Wu, H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry. 148: 80-89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006

Lynch, J.H. y Dudareva, N. 2020. Aromatic amino acids: A complex network ripe for future exploration. Trends in Plant Science. 25: 670-681. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.005

Nagata, M. y Yamashita, I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 39: 925-928. https://doi.org/10.3136/nskkk1962.39.925

Priadkina, G.O. 2020. Influence of trace elements, applied in classical and nano forms, on photosynthesis of higher plants in relation to enhancement of crop productivity. Agricultural Science and Practice. 7: 71-85. https://doi.org/10.15407/agrisp7.03.071

Rana, M., Bhantana, P., Sun, X.C., Imran, M., Shaaban, M., Moussa, M., Saleem, M., Elyamine, A., Binyamin, R., Alam, M., Afzal, J., Khan, I., Din, I., Ahmad, I., Younas, M., Kamran, M. y Hu, C.X. 2020. Molybdenum as an essential element for crops: an overview. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 24:18535. https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.24.004104

Rodrigues, V.A., Crusciol, C.A.C., Bossolani, J.W., Moretti, L.G., Portugal, J.R., Mundt, T.T., de Oliveira, S.L., Garcia, A., Calonego, J.C. y Lollato, R.P. 2021. Magnesium foliar supplementation increases grain yield of soybean and maize by improving photosynthetic carbon metabolism and antioxidant metabolism. Plants. 10: 797. https://doi.org/10.3390/plants10040797

Salehi, B., Sharifi-Rad, R., Sharopov, F., Namiesnik, J., Roointan, A., Kamle, M., Kumar, P., Martins, N. y Sharifi-Rad, J. 2019. Beneficial effects and potential risks of tomato consumption for human health: An overview. Nutrition. 62: 201-208. https://doi.org/10.1016/J.NUT.2019.01.012

Sánchez, E., Ruiz, J.M., Romero, L., Preciado-Rangel, P., Flores-Córdova, M.A. y Márquez-Quiroz, C. 2018. ¿Son los pigmentos fotosintéticos buenos indicadores de la relación del nitrógeno, fósforo y potasio en frijol ejotero? Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 5: 387-398. https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1757

Sariñana-Aldaco, O., Sanchez-Chavez, E., Fortis-Hernandez, M., González-Fuentes, J.A., Moreno-Resendez, A., Rojas-Duarte, A. and Preciado-Rangel, P. 2020. Improvement of the nutraceutical quality and yield of tomato by application of salicylic acid. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 48: 882-892. https://doi.org/10.15835/nbha48211914

Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A. y Mirjalili, M.H. 2018. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. Plant Physiology and Biochemistry. 132: 271-280. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.013

Schmidt, S.B. y Husted, S. 2019. The biochemical properties of manganese in plants. Plants. 8: 381. https://doi.org/10.3390/plants8100381

Singleton, V.L., Orthofer, R. y 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. 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

Steiner, F., Zoz, T., Zuffo, A.M., Pereira-Machado, P., Zoz, J. y Zoz, A. 2018. Foliar application of molybdenum enhanced quality and yield of crispleaf lettuce (*Lactuca sativa* L., cv. Grand Rapids). Acta Agronómica. 67: 73-78. https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.59272

Sutulienė, R., Ragelienė, L., Duchovskis, P. y Miliauskienė, J. 2022. The Effects of Nano-copper,-molybdenum,-boron, and-silica on Pea (*Pisum sativum* L.) Growth, Antioxidant Properties, and Mineral Uptake. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 22: 801-814. https://doi.org/10.1007/s42729-021-00692-w

Wenda-Piesik, A., Kazek, M. y Ropińska, P. 2017. Impact of amino acid biostimulation and microelements fertilization in foliar application on productivity of winter oilseed rape. Fragmenta Agronomica. 34: 119-129.

Westermann, D.T. 2005. Nutritional requirements of potatoes. American Journal of Potato Research. 82: 301-307. https://doi.org/10.1007/BF02871960

Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q. y Cai, Y. 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. BioMed Research International. 2019: 1-11. https://doi.org/10.1155/2019/9732325

Xue, T., Hartikainen, H. y Piironen, V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. Plant and Soil. 237: 55-61. https://doi.org/10.1023/A:1013369804867

Zhishen, J., Mengcheng, T. y 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

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Hongos micorrizícos arbusculares mejoran el establecimiento de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) en condiciones de salinidad

Arbuscular mycorrhizal fungi improve jalapeño pepper plants (*Capsicum annuum* L.) establishment under salinity conditions

Andrés Adrián Urías-Salazar[1], Benjamín Abraham Ayil-Gutiérrez[2], José Alberto López-Santillán[1], Benigno Estrada-Drauaillet[1], Miguel Ángel Cano-González[1], Jesús Guillermo Hernández-Martínez[1] y Wilberth Alfredo Poot-Poot[1]*

[1] Facultad de Ingeniería y Ciencias. Centro Universitario Adolfo López Mateos. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Avenida Universidad. S/N. C.P. 87000. Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

[2] CONAHCYT. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro. S/N. Esquina Elías Piña. Col. Narciso Mendoza. C.P. 88710. Reynosa Tamaulipas, México.

RESUMEN

La salinidad reduce la producción de los cultivos hasta un 50 %. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del producto comercial Suppra® como inóculo micorrícico en la morfología y rendimiento de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) en un suelo con alta concentración de salinidad. Las plantas fueron inoculadas con el producto Suppra® en dosis de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 g / planta utilizando como control plantas sin inocular. En etapa de producción se evaluaron variables morfológicas y de rendimiento. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables morfológicas de altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas, clorofila, número de flores, peso fresco, peso seco y volumen de raíz fueron superiores al control en 18.3, 23.6, 59.2, 13.6, 70.6, 11.6, 14.2 y 120 % en la dosis de 3.0 g. Esta misma tendencia fue observada con las variables de rendimiento, frutos totales, peso total de fruto y peso promedio de frutos con valores de 70.5, 63.3 y 59.2 % respectivamente. La dosis de 3.0 g del producto Suppra® mejoró el crecimiento y rendimiento del cultivo de chile jalapeño en condiciones de salinidad.

Palabras clave: Estrés abiótico, Tolerancia, Simbiosis.

ABSTRACT

Salinity reduces crop production by up to 50 %. The objective of this study was to evaluate the effect of the commercial product Suppra® as a mycorrhizal inoculum on the morphology and yield of jalapeño pepper plants (*Capsicum annuum* L.) in soil with a high concentration of salinity. The plants were inoculated with the product Suppra® at doses of 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 g / plant, using non-inoculated plants as a control. During the production stage, morphological and yield variables were evaluated. The data were analyzed using one-way ANOVA and a Tukey test ($p \leq 0.05$). Morphological variables such as plant height, stem diameter, number of leaves, chlorophyll content, number of flowers, fresh weight, dry weight, and root volume were superior to the control by 18.3, 23.6, 59.2, 13.6, 70.6, 11.6, 14.2, and 120 % respectively at the 3.0 g dose. This same trend was observed with yield variables, including total fruits, total fruit weight, and average fruit weight, with increases of 70.5, 63.3, and 59.2 % respectively. The 3.0 g dose of the product Suppra® improved the growth and yield of jalapeño pepper crops under salinity conditions.

Keywords: Abiotic stress, Tolerance, Symbiosis.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta la humanidad es la escases de alimentos debido a un aumento en la población mundial, además, se estima que para el 2050 la población aumente en 10 mil millones de personas (FAO, 2017). Esta escases, puede magnificarse como consecuencia del cambio climático al ocasionar cambios en la temperatura, escasa precipitación y aumentos en la salinidad de los suelos, que en conjunto originan una disminución en el rendimiento de los cultivos agrícolas (Orosco-Alcalá *et al*., 2018). Por lo tanto, es necesario implementar estrategias que permitan mejorar el rendimiento de los cultivos hasta un 60 % para garantizar el suministro de alimentos a la población creciente (Springmann *et al*., 2018).

La salinidad de los suelos es un estrés que afecta la producción y rendimiento de los cultivos. Esta puede definirse como el aumento de sales solubles que afectan las funciones para el crecimiento normal de las plantas y se consideran salinos cuando la conductividad eléctrica (CE) es de 4 dS m^{-1} (40 mM de NaCl) (Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). Se estima que el aumento de los suelos salinos en los campos agrícolas reducirá la superficie cultivable hasta 50 % para el año 2050 como resultado del cambio climático, la aplicación excesiva de fertilizantes y el manejo inadecuado del suelo (Wang *et al*., 2003; Shrivastava y Kumar, 2015; Muhammad *et al*., 2023).

El chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) es una de las hortalizas ampliamente consumidas a nivel mundial y su consumo *per cápita* oscila entre los 17.2 kg al año (Sánchez-Toledano *et al*., 2023). Sin embargo, *Capsicum annuum* L., es altamente susceptible al estrés por salinidad en donde se ha reportado una disminución de su rendimiento cuando se cultiva en suelos con una conductividad de 4 dSm^{-1} (aproxima-

*Autor para correspondencia: Wilberth Alfredo Poot Poot
Correo-e: wpoot@docentes.uat.edu.mx
Recibido: 30 de Marzo de 2023
Aceptado: 12 de Agosto de 2024
Publicado: 04 de Septiembre de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2011

damente 40 mM). Por lo tanto, surge la necesidad de contar con estrategias que sean amigables con el ambiente y que ayuden a mitigar la salinidad y así asegurar la disponibilidad de esta hortaliza (Wallender y Tanji, 2011; Aktas *et al*., 2006; Wahab *et al*., 2023).

Los efectos tóxicos de la salinidad pueden afectar a los cultivos en diferentes etapas de desarrollo, estos cambios abarcan la reducción de clorofila, disminución de la capacidad fotosintética, alteración del potencial de membrana celular, producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), entre otros (Hussain *et al*., 2017). Todo esto debido a los tres tipos de estrés (osmótico, iónico y oxidativo) que en conjunto afectan negativamente el rendimiento de los cultivos (Ahmadi y Souri, 2018; Kamran *et al*., 2020). Las estrategias utilizadas para reducir el impacto de la salinidad en los suelos agrícolas involucran la aplicación de materia orgánica para reducir la evapotranspiración, lavado de suelos para reducir la concentración de las sales disueltas, encalado para aumentar los niveles de calcio y mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo y el uso de plantas tolerantes a la salinidad (Qadir *et al*., 2007; Stavi *et al*., 2021; Urías-Salazar *et al*., 2023). Sin embargo, todas estas estrategias implican un costo y no resuelven definitivamente el problema. Otra de las alternativas son el uso de microorganismos con capacidad de interactuar con las raíces de los cultivos (interacción planta-microbio), en particular simbiontes fúngicos como hongos micorrícicos, los cuales pueden ayudar a mitigar los efectos del estrés por salinidad (Dastogeer *et al*., 2020).

El uso de hongos micorrícicos arbusculares como inóculos puede mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino (Evelin *et al*., 2019), debido a la simbiosis de las hifas con la zona radicular, las cuales se extienden en el suelo y mejoran la capacidad de la planta para explorar áreas del suelo donde las raíces no llegan; por lo que se mejora la extracción de agua y nutrientes (fósforo, nitrógeno, potasio, zinc y cobre), además de ayudar a mantener el equilibrio iónico y osmótico, así como la activación del sistema antioxidante para evitar daños oxidativos de las EROS, que reducen los efectos nocivos de las sales en el crecimiento de las plantas (Evelin *et al*., 2009; Smith *et al*., 2010; Sheng *et al*., 2011; Khalloufi *et al*., 2017). En este sentido, un estudio reportado por Ait-El-Mokhtar *et al*. (2019), menciona que la simbiosis de AMF fue beneficiosa en plantas de *Ocimum basilicum* L. en regímenes salinos, ya que reduce significativamente los efectos nocivos del estrés salino mejorando significativamente la tasa fotosintética, los rasgos de intercambio de gases, el contenido de clorofila y la eficiencia del uso del agua. Por su parte, Afrangan *et al*. (2023) destacó las funciones reguladoras de las cepas *Glomus versiforme* y *Micrococcus yunnanensis* en el mantenimiento de un estado redox y la homeostasis iónica lo que mejora el crecimiento vegetativo y la asimilación neta en el cultivo de *Brassica napus* L.

Los productos comerciales a base de inoculantes micorrizícos como el MYKE ® PRO GR (contiene las cepas *Rhizophagus irregularis* y *Glomus intraradices*) han demostrado efectividad para reducir los efectos del estrés salino (Rosa *et al*., 2020), sin embargo, una opción prometedora es el producto comercial Suppra® el cual contiene más de 20 cepas fúngicas de los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Paraglomus,* las cuales en conjunto pueden beneficiar el establecimiento del cultivo en condiciones de salinidad. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del producto comercial Suppra® como inóculo micorrícico en la morfología y rendimiento de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) en un suelo con alta concentración de salinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento y material vegetal

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y en el invernadero (23° 42′ 52″ latitud norte y 99° 9′ 15″ longitud oeste a 367 msnm) de la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). Se utilizaron semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) variedad Jalapeño M. de la compañía Vita Hortaflor.

Germinación y producción de plántula

La germinación y producción de plántula se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, donde, se utilizaron charolas germinadoras de poliestireno de 200 cavidades las cuales fueron llenadas con turba (Peat moss®) como sustrato y se sembró una semilla por cavidad a una profundidad de 0.5 cm. Las charolas se transfirieron a un anaquel con lámparas de luz led (55 µmol $m^{-2}s^{-1}$) a 25°C durante 15 d. Después de la germinación, las plántulas fueron regadas cada tercer día con 100 mL / planta de una solución nutritiva de Hoagland y Arnold (1950), compuesta por NH_4NO_3, H_3PO_4, KNO_3, Ca (NO_3) y $MgSO_4$. Una vez que las plántulas desarrollaron de 6 a 8 hojas verdaderas, se llevaron al invernadero (humedad relativa de 60 % y temperatura de 31 °C) para su adaptación durante tres días y posterior trasplante.

Trasplante e inoculación con hongos micorrizícos

Las plántulas aclimatadas en el invernadero se trasplantaron en bolsas negras de polietileno de 40 × 40 cm, las cuales se llenaron con un suelo franco arcilloso obtenido de parcelas con altos niveles de aplicación de fertilizantes y que durante su análisis presentó una textura franco arcilloso con un pH moderadamente alcalino (7.70), alta conductividad eléctrica (9.01 dS m^{-1}), materia orgánica (4.37 %), N disponible (0.26 %), P disponible (100.8 mg kg^{-1}), K intercambiable (1.42 meq / 100 g), Fe (3.52 mg kg^{-1}), Zn (5.43 mg kg^{-1}) y carbonatos totales (26.1 %). Asimismo, previo al trasplante y al análisis de suelo cabe mencionar que se realizó la desinfección del suelo, la cual, consistió en aplicar una solución de formol al 4 % de manera manual, donde, el suelo tratado fue cubierto por un plástico impermeable durante 24 h, posteriormente, el plástico fue retirado y el suelo se dejó ventilar hasta que desapareciera el olor a formol.

Manejo agronómico

Se realizaron riegos auxiliares de 500 o 1000 mL / planta de solución nutritiva de Hoagland y Arnold (1950), de acuerdo

con la turgencia de las plantas y las condiciones climáticas. Los riegos con la solución nutritiva fueron ajustados de acuerdo con la etapa fenológica de las plantas. El manejo fitosanitario se realizó de manera preventiva con los siguientes productos: impiremax (imidacloprid) para ataque de mosquita blanca (*Bemicia tabasi*), mientras que, para el control de enfermedades fúngicas fue utilizado promyl (benomilo), el cual, fue aplicado al suelo 15 d antes de la inoculación con micorrizas.

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la inoculación de seis dosis del producto micorrícico Suppra®, los cuales consistieron en: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 g / planta respectivamente y como control se utilizaron plántulas sin inocular. Se realizaron tres inoculaciones con el producto, la primera al momento del trasplante a bolsa definitiva, la segunda a los 25 días después de siembra (dds) y la tercera a los 40 dds; dichas inoculaciones se realizaron de manera superficial en la base del tallo. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, en donde una planta representó una unidad experimental.

Variables evaluadas

Las variables morfológicas y de rendimiento se midieron a los 90 después del trasplante, es decir, cuando las plantas alcanzaron la etapa de producción. Entre las variables morfológicas se encuentran: altura de planta (AP), la cual se midió con una cinta métrica, diámetro de tallo (DT), el cual se registró con un vernier digital (Steren®), mientras que la clorofila se determinó mediante el equipo SPAD-502Plus. El número de hojas (NH) y área foliar (AF) se determinaron con el programa ImageJ versión 1.46r. Asimismo, se determinó el volumen de raíz (VR) por desplazamiento de agua mediante una probeta graduada, el peso fresco (PF) y peso seco (PS) obtenido en una estufa de aire forzado (Riossa H-33) y los pesos fueron registrados mediante una balanza analítica (Pioneer TM de OHAUS), mientras que número de flores (NF) fue por conteo visual.

Como variables de rendimiento se midieron: frutos totales (FT), peso total de fruto (PTF) y peso promedio de fruto (PPF) registrándose con una balanza analítica (Pioneer TM de OHAUS) graduada en gramos (g), longitud de fruto (LF) y diámetro de fruto (DT) se midió con un vernier digital (Steren®).

Análisis estadístico

Los datos de obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, mientras que las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) usando el software Minitab 19®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables morfológicas y clorofila

La adición del producto comercial de inóculos micorrizícos Suppra® en el suelo tuvo una influencia significativa ($p \leq 0.05$) en todas variables morfológicas evaluadas, así como en el contenido de clorofila (U-SPAD) en plantas de chile jalapeño (Tabla 1). La respuesta en cada una de las dosis estudiadas fue variable, siendo la dosis de 3.0 g la que presentó los mejores resultados con aumentos de 18.3, 23.6, 59.2, 13.6, 70.6, 11.6 y 14.2 % en las variables AP, DT, NH, CL, NF, PF y PS (excepto AF) con respecto al control, sin embargo, para las variables de AP, DT y NH se observó diferencia en todas las dosis aplicadas con respecto al control. Mientras que con la dosis de 4.0 g, se registraron disminuciones en NH, CL, NF, PF y PS de 41.3, 12.3, 56.9, 9.1 y 14.2 % a diferencia de AP y DT que fueron superiores en 3.7 y 1.4 % en comparación con la dosis de 3.0 g. Sin embargo, a dosis más bajas (0.5, 1.0 y 2.0 g) solamente el 50 % de las variables presentaron mejorías con respecto a la dosis control (Tabla 2).

La aplicación de hongos micorrícicos arbusculares en plantas ha demostrado efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de plantas cultivadas bajo condiciones de estrés por salinidad. En este sentido, Ait-El-Mokhtar *et al*. (2019), reportaron que la inoculación de la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) con hongos micorrizícos arbusculares *Glomus* sp. (15 esporas / g suelo), *Sclerocystis* (9 esporas / g suelo) y *Acaulospora* sp. (1 espora / g suelo) mejoraron la altura de planta (AP), número de hojas (NH), área foliar (AF) y peso fresco de plantas (PF) en 15.38, 32.25, 78.99 y 222.01 % respectivamente con respecto a las plantas sin inocular. Por su parte, Liang *et al*. (2022) mencionan que con la aplicación de 120 g (1800 esporas) del hongo micorrícico arbusculares de la especie *Paraglomus occultum*, las plantas de tomate presentaron aumentos importantes en las variables morfológicas de altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), peso

Tabla 1. Cuadrados medios y significancia estadística de variables morfológicas y clorofila en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con micorrizas.
Table 1. Mean squares and statistical significance of morphological variables and chlorophyll in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) plants inoculated with mycorrhizae.

FV	AP	DT	NH	AF	CL	NF	PF	PS
Micorrizas	166.30 *	5.18 *	6578 *	448.73 *	54.18 *	161.94 *	3848.49*	52.35*
Error	51.69	0.22	1026	22.09	10.05	29.54	106.01	10.06
CV (%)	12.84	9.59	21.68	19.31	3.71	6.38	16.26	9.43

FV= fuente de variación; CV= coeficiente de variación; AP= altura de planta; DT= diámetro de tallo; NH= número de hojas; AF= área foliar; CL= clorofila; NF= número de flores; PF= peso fresco; PS= peso seco; *= significativo con $p \leq 0.05$.

Tabla 2. Comparación de medias de las variables morfológicas y clorofila en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con micorrizas.
Table 2. Comparison of means of morphological variables and chlorophyll in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) plants inoculated with mycorrhizae.

Trat. (g)	AP (cm)	DT (mm)	NH	AF (cm^2)	CL (SPAD)	NF	PF (g)	PS (g)
Cont.	53.0 b	7.2 c	167.0 b	17.1 a	46.0 b	10.2 b	225.8 bc	47.6 d
0.5	61.8 a	8.7 a	237.3 a	14.5 b	47.0 b	12.5 b	243.4 ab	51.3 abc
1.0	62.2 a	8.0 b	282.0 a	12.2 c	46.7 b	12.3 b	182.9 d	44.3 d
2.0	61.7 a	8.0 b	277.0 a	14.6 b	48.1 b	12.1 b	217.4 c	55.2 a
3.0	62.7 a	8.9 a	266.0 a	16.8 a	52.3 a	17.4 a	252.1 a	54.4 ab
4.0	64.7 a	9.0 a	197.0 ab	14.5 b	46.6 b	11.6 b	159.4 e	48.8 bcd
CV %	11.98	0.78	3.73	0.54	5.28	6.69	16. 26	9.43
Pro.	61.0	8.3	237.7	14.9	47.7	12.6	213.5	50.2

Trat= tratamiento; Cont= Control; CV= coeficiente de variación; Pro= promedio; AP= altura de planta; DT= diámetro de tallo; NH= número de hojas; AF= área foliar; CL= clorofila; NF= número de flores; PF= peso fresco; PS= peso seco. Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey; $P \leq 0.05$).

fresco (PF) y en el contenido de clorofila (CL) en 40.51, 36.84 y 43.33, 70.88 % respectivamente con respecto a las plantas control. Mientras que Vosnjak *et al*. (2021) en su estudio con plantas de Ajania (*Ajania pacifica* (Nakai) Bremer et Humphries) la inoculación con el producto Symbivit (Symbiom Ltd., Sázava, República Checa) a base de hongos micorrizícos arbusculares resultó en una mejoría en el número de flores (NF) de 365 % con respecto a las plantas que no se inocularon. Asimismo, Chen *et al*. (2022) reportaron que el hongo micorrícico *Rhizophagus intraradices* al inocularse en plantas de frambuesa, estas mostraron cambios significativos en el número de flores (NF) de 33 % en comparación con las plantas que no se les aplicó la micorriza. En el presente estudio, las dosis evaluadas influenciaron positivamente a la mayoría de las variables morfológicos con respecto al control, sin embargo, el NF que tuvo un aumento del 70.6 % con la dosis de 3.0 g / planta, pudiera explicar el rendimiento obtenido en chile jalapeño (Tabla 2 y 4).

Por otra parte, se ha mencionado que los efectos positivos de los hongos micorrizícos pueden relacionarse también con el número de cepas presentes en el producto comercial en estudio. En este trabajo el producto comercial incluyó un consorcio de hongos micorrizícos arbusculares de los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Paraglomus* con la presencia de 20 especies (cepas), el cual pudiera tener una mayor efectividad para ayudar a mitigar los efectos negativos del estrés causado por la salinidad del suelo y en consecuencia mejorar el rendimiento del chile jalapeño (Tabla 3 y 4). De acuerdo con Sheng *et al*. (2011), la aplicación del del hongo micorrizico arbuscular (HMA) *Glomus mosseae* mejoró el desarrollo de biomasa vegetal y la acumulación de solutos orgánicos en hojas de maíz, asimismo, esta simbiosis elevó las concentraciones de azúcares solubles, azúcares reductores, proteína soluble, ácidos orgánicos totales, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido acético, ácido málico y ácido cítrico, lo cual, podría ayudar a mitigar el estrés salino. Por su parte Hashem *et al*. (2018) mencionan que la aplicación de HMA mejoró el establecimiento de pepino en condiciones salinas, esto al mitigar los efectos negativos de la salinidad por medio de la estimulación de las actividades de las enzimas antioxidantes (catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) encargadas de la eliminación de radicales libres.

En cuanto al sistema radicular el producto comercial Suppra® aumentó el volumen de raíz en 20, 140 y 20 % en las dosis de 2.0, 3.0 y 4.0 g $planta^{-1}$ con respecto al control. Esta misma tendencia fue reportada por Kumar *et al*. (2010) quienes reportaron una mayor longitud y biomasa del sistema radicular de plantas de *Jatropha curcas* al inocularlas con hongos micorrizícos conformados por las especies de *Glomus mosseae*, *Glomus microcarpum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Gigaspora margarita* y *Gigaspora heterogama* en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas cuando las plantas crecieron en estrés salino (CE de 7.2 dS m^{-1}). Asimismo, Chen *et al*. (2017) observaron que la inoculación de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Zhongnong No. 106) con dos preparaciones a base de inoculantes micorrizícos VT (*Claroideoglomus* sp., *Funneliformis* sp., *Diversispora* sp., *Glomus* sp. y *Rhizophagus* sp.) y BF (*G. intraradices*, *G. microageregatum* BEG y *G. Claroideum* BEG 210, y *Funneliformis mosseae* (Fm)), mejoraron el desarrollo de la zona radicular en 52.81 y 24.91 % respectivamente.

Este aumento de volumen del sistema radicular permitió que las plantas de chile jalapeño tuvieran mayor exploración en el estrato del suelo y por lo tanto una mejor absorción de agua y nutrientes lo que se reflejó en las variables morfológicas y de rendimiento (Tabla 2 y 4), debido a que la raíz es el órgano principal y de ella dependen estrictamente el resto de los órganos de la planta (Evelin *et al*., 2019; Uga, 2021). En condiciones óptimas de desarrollo, las plantas utilizan la energía fotosintética para el mantenimiento general y una pequeña parte de esta energía es utilizada para la producción de biomasa (Smith *et al*., 2023), sin embargo, en condiciones de estrés salino existe un mayor gasto energético para el mantenimiento y sobrevivencia de la planta, lo que se traduce en una disminución de la biomasa (Kumar *et al*.,

2022). En nuestro estudio, se pudo observar que la salinidad afectó negativamente el volumen de raíz en plantas control, no obstante, la simbiosis entre las micorrizas y la zona radicular favoreció el aumento del volumen de raíz en plantas de chile jalapeño (Figura 1 y 2 E).

Variables de rendimiento en chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.)

En cuanto a las variables de rendimiento, únicamente se detectaron diferencias significativas en frutos totales (FT), peso total de frutos (PTF) y peso promedio de fruto PPF) en plantas de chile jalapeño tratadas con la micorriza (Tabla 3). Las plantas inoculadas con la dosis de 0.5 g de Suppra® mostraron incrementos de 22.5 y 35.6 % en las variables de frutos totales (FT) y peso promedio de frutos (PPF) respectivamente. Mientras que, con la dosis de 1.0 g solamente se observó 20.5 % de aumento en la variable de FT. A pesar de que en las dosis de 2.0, 3.0 y 4.0 g se detectaron cambios en las variables de FT, PTF y PPF, estos fueron más evidentes en la dosis de 3.0 g de Suppra® al obtenerse aumentos de 70.5, 63.3 y 59.2 % respectivamente con respecto al control (Tabla 4).

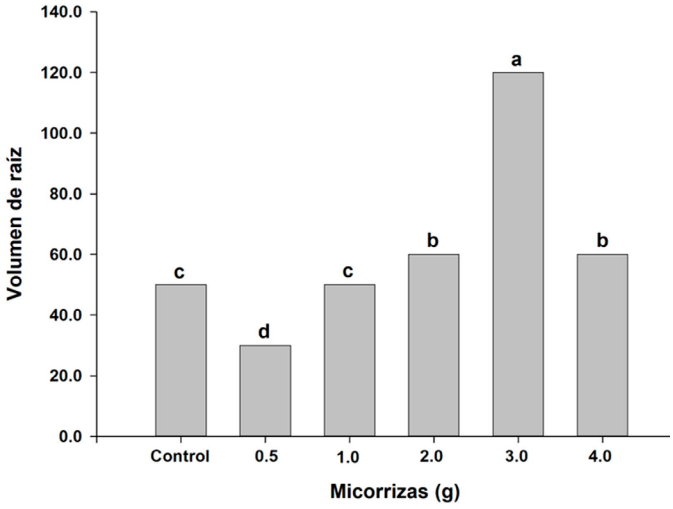


Figura 1. Volumen de raíz en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) a diferentes dosis de micorrizas Suppra®.
Figure 1. Root volume in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) plants at different doses of Suppra® mycorrhizae.

Los cambios en FT, PTF y PPF pueden atribuirse a una mayor absorción de nutrientes y agua debido a la simbiosis entre la raíz y la micorriza, que se reflejó en una mayor producción de frutos. Al respecto, Selvakumar y Thamizhiniyan (2011) mencionan que la inoculación con micorrizas mejoró el crecimiento y rendimiento de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) en condiciones de estrés salino, atribuyendo esta adaptación a la reducción de Na^+ en las hojas, así como a una mejor estabilidad de la membrana celular y mejor transporte de nutrientes (N, P, K). Por su parte, Biel *et al*. (2021) reportaron una mejoría del rendimiento en 21 % al aplicar el hongo micorrizíco arbuscular *Rhizoglomus irregulare* en el cultivo del tomate. Mientras que Chen *et al*. (2022) evaluaron en su experimento el efecto de los tratamientos a base de fertilizantes, polinización, micorrizas y observaron que con la inoculación del hongo micorrizico *Rhizophagus intraradices*, el rendimiento de fruto se mejoró en 43 % en plantas de frambuesa cv. Tulameen en comparación con las plantas control.



Figura 2. Efecto de las dosis de micorrizas Suppra® en la zona radical de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). A) Control; B) 0.5 g; C) 1.0 g; D) 2.0 g; E) 3.0 g y F) 4.0 g (barra de escala: 5 cm).
Figure 2. Effect of Suppra® mycorrhizae doses on the root zone of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.). A) Control; B) 0.5 g; C) 1.0 g; D) 2.0 g; E) 3.0 g and F) 4.0 g (scale bar: 5 cm).

Tabla 3. Cuadrados medios y significancia estadística de variables de rendimiento en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con micorrizas.
Table 3. Mean squares and statistical significance of yield variables in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) plants inoculated with mycorrhizae.

FV	FT	PTF	PPF	LF	DF
Micorrizas	60.22 *	2324 ns	78.15 *	224.24 ns	27.18 ns
Error	16.15	1992	14.26	49.54	8.02
CV (%)	6.69	4.25	20.97	11.73	4.71

FV= fuente de variación; CV= coeficiente de variación; FT= frutos totales; PTF= peso total de frutos; PPF= peso promedio de frutos; LF= longitud de fruto; DF= diámetro de fruto; *= significativo con p ≤ 0.05.

Tabla 4. Comparación de medias Tukey de variables rendimiento en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con micorrizas.
Table 4. Comparison of Tukey means of yield variables in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) plants inoculated with mycorrhizae.

Tratamiento g	FT	PTF (g)	PPF (g)	LF (mm)	DF (mm)
Control	10.2 b	71.5 c	21.6 b	40.2 a	16.7 a
0.5	12.5 ab	83.5 b	29.3 ab	33.6 ab	14.6 ab
1	12.3 ab	83.8 b	21.8 b	27.6 b	12.1 b
2	12.1 ab	85.4 b	24.1 ab	37.9 a	14.9 ab
3	17.4 a	116.8 a	34.2 a	38.0 a	15.7 ab
4	11.6 b	93.1 b	29.9 a	39.4 a	16.2 a
CV (%)	6.69	4.25	20.97	11.73	4.71
Promedio	12.68	89.01	26.81	36.11	15.03

CV= coeficiente de variación; FT= frutos totales; PTF= peso total de frutos; PPF= peso promedio de frutos; LF= longitud de fruto; DF= diámetro de fruto; Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey; P ≤ 0.05).

El estrés salino es una de las principales causas que afecta el desarrollo y crecimiento de las plantas debido a los daños que ocasiona a nivel celular, bioquímico, fisiológico y molecular que en su conjunto afectan el rendimiento de los cultivos (Garg y Bharti, 2018). Sin embargo, en el presente estudio claramente se pudo observar que la aplicación de la micorriza tuvo un efecto positivo en el rendimiento de chile jalapeño bajo estrés salino. Esto puede deberse a los beneficios atribuidos a las micorrizas como son la exclusión del Na^+ al discriminar su absorción del suelo durante su transferencia a la planta (Hammer *et al*., 2011), mantenimiento del equilibrio osmótico, estimulación de las enzimas antioxidantes, protección del sistema fotosintético (Khalloufi *et al*., 2017), aumento de la absorción de fósforo, de macro y micronutrientes (Hart y Forsythe, 2012), lo que se traduce en un mejor desarrollo del sistema radicular, mayor capacidad de exploración del suelo, mejor transporte de nutrimentos (fotosintatos) que permiten un aumento en variables asociadas al rendimiento (Sadhana, 2014).

CONCLUSIONES

La inoculación con el producto comercial Suppra® a base de hongos micorrizícos mejoró el establecimiento de las plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) por medio de un mayor desarrollo en las variables morfológicas y de rendimiento, la cual fue más evidente en la dosis de 3.0 g / planta ya que mostró mayor aumentó en el número y peso de frutos. Por lo que esta dosis puede utilizarse como inóculo en este cultivo para mitigar el estrés por salinidad, debido a que las variables morfológicas y de rendimiento evaluadas fueron afectadas en menor grado bajo estas condiciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (No. 784170) al primer autor. También, a la Facultad de Ingeniería y Ciencias (FIC) perteneciente a la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT) por facilitar sus instalaciones para el desarrollo de la investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Ahmadi, M., y Souri, M.K. 2020. Growth characteristics and fruit quality of chili pepper under higher electrical conductivity of nutrient solution induced by various salts. AGRIVITA, Journal of Agricultural Science. 42(1):143-152. https://doi: 10.17503/agrivita.v42i1.2225.

Ait-El-Mokhtar, M., Laouane, R.B., Anli, M., Boutasknit, A., Wahbi, S., y Meddich, A. 2019. Use of mycorrhizal fungi in improving tolerance of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings to salt stress. Scientia Horticulturae. 253: 429-438. https:// doi: 10.1016/j.scienta.2019.04.066.

Aktas, H., Abak K., y Cakmak I. 2006. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. Scien-tia Horticulturae. 110: 260-266. https://doi: 10.1016/j.scienta.2006.07.017.

Argentel, M.L., Fonseca R.I., Garatuza P.J., Yépez G.E., y González A.J. 2017. Efecto de la salinidad en callos de variedades de trigo durante el cultivo *in vitro*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8: 477-488. https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.25.

Biel, C., Camprubí, A., Lovato, P.E., y Calvet, C. 2021. On-farm reduced irrigation and fertilizer doses, and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improve water productivity in tomato production. Scientia Horticulturae. 288, 110337. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110337.

Castellón-Martínez, E., Chávez-Servia, J.L., Carrillo-Rodríguez, J.C., y Vera-Guzman, A.M. 2012. Pre-ferencias de consume de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 5:27-35.

Chen, K., Kleijn, D., Scheper, J., y Fijen, T.P. 2022. Additive and synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi, insect pollination and nutrient availability in a perennial fruit crop. Agriculture, Ecosystems & Environment. 325, 107742. https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107742.

Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jian, Y., Liu, A., Zhao P., Wang M., y Ahammed, G.J. 2017. Combined inoculation with multiple arbuscular mycorrhizal fungi improves growth, nutrient uptake and photosynthesis in cucumber seedlings. Frontiers in Microbiology. 8, 2516. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02516.

Dastogeer, K.M., Zahan, M.I., Tahjib-Ul-Arif, M., Akter, M.A., y Okazaki, S. 2020. Plant salinity tolerance conferred by arbuscular mycorrhizal fungi and associated mechanisms: a meta-analysis. Frontiers in Plant Science. 11, 588550. https:// doi.org/10.3389/fpls.2020.588550.

Evelin, H., Devi, T.S., Gupta, S., y Kapoor, R. 2019. Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. Frontiers in Plant Science. 10:470. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00470.

Evelin, H., Kapoor, R., y Giri, B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. Annals of botany. 104(7): 1263-1280. https://doi.org/10.1093/aob/mcp251.

Garg, N., y Bharti, A. 2018. Salicylic acid improves arbuscular mycorrhizal symbiosis, and chickpea growth and yield by modulating carbohydrate metabolism under salt stress. Mycorrhiza. 28(8): 727-746.

Hammer, E., Nasr, H., Pallon, J., Olsson, P., y Wallander, H. 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. Mycorrhiza. 21:117-129. https://doi: 10.1007/s00572-010-0316-4.

Hart, M.M., y Forsythe, J.A. 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops, nutritional benefits in addition to phosphorus. Scientia Horticulturae. 148:206-214. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.018.

Hashem, A., Alqarawi, A.A., Radhakrishnan, R., Al-Arjani, A.-B.F., Aldehaish, H.A., Egamberdieva, D., y Abdallah, E.F. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi regulate the oxidative system, hormones and ionic equilibrium to trigger salt stress tolerance in *Cucumis sativus* L. Saudi Journal of Biological Sciences. 25, 1102-1114. https://doi: 10.1016/j.sjbs.2018.03.009.

Hoagland, D.R., y Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular & California Agricultural Experiment Station. 347, 32.

Hussain, S., Zhang, J.H., Zhong, C., Zhu, L.F., Cao, X.C., Yu, S.M., Bohr, J.A., Hu, L., y Jin, Q.Y. 2017. Effects of salt stress on rice growth, development characteristics, and the regulating ways: A review. Journal of integrative agriculture. 16(11): 2357-2374. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61608-8.

Kamran, M., Parveen, A., Ahmar, S., Malik, Z., Hussain, S., Chattha, M.S., Saleem, M.H., Adil, M., Heidari, P., y Chen, J.T. 2020. An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation. International Journal of Molecular Sciences. 21(1):148. https://doi.org/10.3390/ijms21010148.

Khalloufi, M., Martínez-Andújar, C., Lachaâl, M., Karray-Bouraoui, N., Pérez-Alfocea, F., y Albacete, A. 2017. The interaction between foliar GA_3 application and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improves growth in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants by modifying the hormonal balance. Journal of Plant Physiology. 214: 134-144. https://doi: 10.1016/j.jplph.2017.04.012.

Kumar, A., Sharma, S., y Mishra, S. 2010. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. Journal of Plant Growth Regulation. 29; 297-306. https://doi: 10.1007/s00344-009-9136-1.

Kumar, A., Yadav, A., Dhanda, P.S., Delta, A.K., Sharma, M., y Kaushik, P. 2022. Salinity stress and the influence of bioinoculants on the morphological and biochemical characteristics of faba bean (*Vicia faba* L.). Sustainability. 14(21): 14656. https://doi.org/10.3390/su142114656.

Liang, S.M., Li, Q.S., Liu, M.Y., Hashem, A., Al-Arjani, A.B.F., Alenazi, M.M., Abd, W.F., Muthu-ramalingam, P., y Wu, Q.S. 2022. Mycorrhizal effects on growth and expressions of stress-responsive genes (aquaporins and SOSs) of tomato under salt stress. Journal of Fungi. 8(12): 1305. https://doi.org/10.3390/jof8121305.

Muhammad, M., Waheed, A., Wahab, A., Majeed, M., Nazim, M., Liu, Y.H., y Li, W.J. 2023. Soil salinity and drought tolerance: An evaluation of plant growth, productivity, microbial diversity, and amelioration strategies. Plant Stress. 100319. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100319.

Munns, R., y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology. 59:651-81. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

Navarro, J.M., Flores, P., Garrido C., y Martínez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry 96: 66-73. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.057.

Qadir, M., Oster, J.D., Schubert, S., Noble, A.D., y Sahrawat, K.L. 2007. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. Advances in Agronomy. 96, 197-247. doi:10.1016/s0065-2113(07)96006-x.

Rosa, D., Pogiatzis, A., Bowen, P., Kokkoris, V., Richards, A., Holland, T., y Hart, M. 2020. Performance and establishment of a commercial mycorrhizal inoculant in viticulture. Agriculture. 10(11), 539. doi.org/10.3390/agriculture10110539.

Sadhana, B. 2014. Arbuscular mycorrhizal Fungi (AMF) as a Biofertilizer-a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(4): 384-400.

Sánchez-Toledano, B.I., Camarena-Gómez, D.M.J., López-Santiago, M.A., y Cuevas-Reyes, V. 2023. Consumer preferences of jalapeño pepper in the mexican market. Horticulturae. 9(6), 684. doi.org/10.3390/horticulturae9060684.

Selvakumar, G., y Thamizhiniyan, P. 2011. The effect of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus Glo-mus intraradices on the growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under salinity stress. World Applied Sciences Journal. 14(8): 1209-1214.

Sheng, M., Tang, M., Zhang, F., y Huang, Y. 2011. Influence of arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. Mycorrhiza. 21: 423-430. doi: 10.1007/s00572-010-0353-z.

Shrivastava, P., y Kumar R. 2015. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promot-ing bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi Journal of Biological Sciences. 22: 123-131.

Smith, S.E., Facelli, E., Pope, S., y Smith, F.A. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. Plant Soil. 326, 3-20. https://doi: 10.1007/s11104-009-9981-5.

Smith, E.N., van Aalst, M., Tosens, T., Niinemets, Ü., Stich, B., Morosinotto, T., Morosinotto T., Alboresi, A., Erb, T.J., Go, P.A., Gómez-Coronado, Tolleter, D., Finazzi, G., Curien, G., Heinemann, M., Ebenhoh, O., Hibberd, J.M., Schluter, U., Sun, T., y Weber A.P.M. 2023. Improving photosynthetic efficiency toward food security: Strategies, advances, and perspectives. Molecular Plant. 16, 1547-1563. https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.08.017.

Stavi, I., Thevs, N., y Priori, S. 2021. Soil salinity and sodicity in drylands: A review of causes, effects, monitoring, and restoration measures. Frontiers in Environmental Science. 330. https://doi: 10.3389/fenvs.2021.712831.

Tester, M., y Davenport R. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91: 503-527.

Uga, Y. 2021. Challenges to design-oriented breeding of root system architecture adapted to climate change. Breeding science. 71(1): 3-12. https://doi: 10.1270/jsbbs.20118.

Urías-Salazar, A.A., Ayil-Gutiérrez, B.A., Segura-Martínez, M., T. de J., Silva-Espinosa, J.H.T., Delgado-Martínez, R., y Poot-Poot, W.A. 2023. Lethal dose 50 of NaCl and ethyl methanesulfonate in jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings and tolerance to salinity. Ciência e Agrotecnologia. 47, e015722. http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054202347015722.

Vosnjak, M., Likar, M., y Osterc, G. 2021. The effect of mycorrhizal inoculum and phosphorus treatment on growth and flowering of Ajania (*Ajania pacifica* (Nakai) Bremer et Humphries) plant. Horticulturae. 7(7), 178. https://doi.org/10.3390/horticulturae7070178.

Wahab, A., Muhammad, M., Munir, A., Abdi, G., Zaman, W., Ayaz, A., Khizar, C., y Reddy, S.P.P. 2023. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in regulating growth, enhancing productivity, and potentially influencing ecosystems under abiotic and biotic stresses. Plants. 12(17), 3102.

Wallender W.W., y Tanji K.K. 2011. Agricultural salinity assessment and management. American So-ciety of Civil Engineers; Reston, VA, USA. https://doi.org/10.1061/9780784411698.

Wang, W., Vinocur B., y Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 218:1-14. https://doi: 10.1007/s00425-003-1105-5.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* in polyvinyl alcohol matrices, a combined effect for *Pieris brassicae* control

Tierra de diatomea y *Bauveria bassiana* en matrices de alcohol polivinilico, un efecto combinado para el control de *Pieris brassicae*

Fernando Zárate-Rivas[1],Delfino Reyes-López[1], Fabiel Vázquez-Cruz[1], and Carmela Hernández-Domínguez[1]* ✉
[1] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, Avenida Universidad 59, Primera. San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México.

ABSTRACT
Cabbage larvae (*Pieris brassicae*, Lepidoptera: Pieridae) are an important pest in organic farming; therefore, biological pest control alternatives are being sought. The effect of *Beauveria bassiana* (Bb) combined with diatomaceous earth (DE) in a polyvinyl alcohol flask (Bbl), as well as the combination between them (Bb+DE, Bbl+DE) on *P. brassicae* and *Galleria mellonella* larvae inoculated by aspersion or immersion was evaluated. Prior to the experiment, the viability of *B. bassiana* was assessed and one of three commercial brands of diatomaceous earth was selected based on the shape and damage caused to *G. mellonella*. Radial shapes with and without edges were more common in the diatomaceous earth types, but these did not define efficacy on cuticle damage. The result showed that the Bb+DE treatment had greater damage, followed by the Bbl+DE treatment applied by aspersion. The highest mortality in *G.mellonella* was 70.1 % with Bb at 120 h after sprinkled, while in *P. brassicae*, mortality reached 42.1 % with Bbl+DE; thus, it is important to highlight the importance of the inoculation method and larvae types used when effectiveness bio-trials are performed.
Keywords: Polyvinyl alcohol, Aspersion, *B. bassiana*, Mortality, Plague.

RESUMEN
La larva de la col (*Pieris brassicae*, Lepidóptera: Pieridae), es una plaga importante en la agricultura orgánica, por lo que se buscan alternativas para su control. En este estudio, se evaluó el efecto de *Beauveria bassiana* sola (Bb) y combinada con tierra de diatomea (TD) en matrices de alcohol polivinílico (Bbl), así como la combinación entre estos (Bb+TD, Bbl+TD) en larvas de *P. brassicae* y *Galleria mellonella* inoculadas por aspersión y por inmersión. Previo al experimento, se evaluó la viabilidad de *B. bassiana*, y seleccionó una de tres marcas comerciales de tierra de acuerdo con su forma y daño provocado en *G. mellonella*, donde las formas radiales con y sin borde fueron mas frecuentes en los tipos de tierra, sin embargo, estas no definieron la eficacia en daño de cutícula. El resultado mostró que el tratamiento Bb+TD tuvo mayor daño, seguido del tratamiento Bbl+TD aplicados por aspersión. La mortalidad más alta en *G. mellonella* fue 70.1 % con Bb a las 120 h después de aperjado, mientras que en *P. brassicae* la mortalidad alcanzó 42.1 % con Bbl+TD, por lo que hay que destacar la importancia del método de inoculación y el tipo de larva utilizada al realizar bioensayos de efectividad.
Palabras clave: Alcohol polivinílico 1, Aspersión, *B. bassiana* 2, mortalidad 3, plaga.

INTRODUCTION
Cabbage is one of the most relevant crops in the Central America and Caribbean zones, also with great economic importance since it is one of the cruciferous vegetables of greatest consumption (Mujica *et al*., 2009); there is an annual production of 204 thousand tons only in Mexico (SIAP, 2019). Although it is susceptible to damage by Lepidoptera species, *P. brassicae* stands out, this plague is capable of devouring a great number of leaves, leading to important production losses (Abbas *et al*., 2021).

The last decade has given special importance to ecological soil handling and nutrition, recognizing the organic production in Latin America, Asia, and European countries, due to its contribution to sustainable development (Schwentesius and Gómez, 2015; Willer, 2021) and, with the chemical products elimination, keeping the soil quality and fertility. On the other hand, the excessive use of pesticides harms the environment, indirectly contributing to the elimination of the natural enemies of plagues (Del Puerto *et al*., 2014; Castro *et al*., 2022). Recently, special attention has been given to the use of entomopathogenic microorganisms, which cause lethal infection of pests and have been shown to have significant broad-spectrum effects on pest species that damage crops (Bacca and Lagos, 2014; Pacheco *et al*., 2019). *B. bassiana* species are entomopathogenic fungi with great potential in diverse insect plague management, due to the biosynthesis of diverse cyclopeptide compounds, that act against fungal virulence (Wang, 2017). However, when applied in field conditions, entomopathogen microorganisms are affected by several factors, such as temperature, humidity, and solar radiation. Therefore, they need to be formulated in a method that enhances their efficacy, and to achieve this, the fungi are retained in immobilization matrices that protect the spores from environmental threats, thereby extending their shelf life when applied in the field (Azamar-Jiménez, 2018; Litwin *et al*., 2020).

On the other hand, the use of additives in biological control products is of great importance as it increases the efficacy of the formulations; one of these products is diatomaceous earth, which consists of crystalized algae microfos-

*Autor para correspondencia: C. Hernández Domínguez
Correo-e: carmela.hernandezd@correo.buap.mx
Recibido: August 2, 2023
Aceptado: April 3, 2024
Publicado: May 10, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2124

sils that cause injuries in the insect body (Losic and Korunic, 2018; Bachrouch *et al*., 2022). However, little is known about the combined effect of diatomaceous earth with *B. bassiana* matrices for plague control. Therefore, the aim of this research was to evaluate the effect of diatomaceous earth in combination with the entomopathogenic fungi *B. bassiana* immobilized in polyvinyl alcohol matrices, as a biological agent against *P. brassicae* in cabbage crops.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining *B. bassiana* strains, *P. brassicae* larvae and diatomaceous earth

B. bassiana OM839761

The strain was obtained from the collection of the Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Sample was defrosted and 100 µL were inoculated in solid Agar Dextrose Sabouraud (ADS) medium, and then incubated at 32 °C± 2 for 5 d, and the grown mycelium was collected with the aid of a spatula to create the treatments.

Larvae used in the experiment

Ninety *G. mellonella* larvae were used as reference insects, obtained from the Escuela Tecnológica Superior of Zacapoaxtla; also, 90 *P. brassicae* larvae were obtained from a cabbage crop naturally infested, located at the Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias.

Diatomaceous earth used

Food grade quality, micronized, and organic Diatomaceous earth was acquired from GOSA©, Echinocactus©, and Lombriz MX© brands, and purchased from different commercial stores.

Selection of diatomaceous earth by the shape and percentage damage to larval cuticle prior to experiment

Present shapes in terms of diatomaceous earth brand

To select the diatomaceous earth, the efficacy of three brands was evaluated and three 600 mL solutions were prepared at concentrations of 0.01 g/mL, 0.002 g/mL, and 0.001 g/mL. With a Neubauer camera in a Leyca DM750 compound microscope the percentage of algal shell shapes present in each sample was quantified; then, 10 *G. mellonella* larvae in the last instar were added and manually shaken for 10 seconds at each concentration according to Vargas-Flores (2003). Finally, were placed over pieces of sterile moist paper towels contained in 140 x 20 mm capacity Petri dishes.

Diatomaceous earth damage on the cuticle of *G. mellonella*

After 48 h of inoculation, a 5 mm^2 incision was made on the dorsal part of the larval skin. The incision was then cleaned of fat residues and observed under the microscope to determine the percentage of spots (damage) over the cuticle. This data was subsequently correlated with the percentage of shell shapes.

Treatment preparation and inoculation of *G. mellonella* and *P. brassicae* with *B. bassiana* larvae

For the prepration of the treatment one (Bb) which consisted of *B. bassiana* 1 x 10^6 conidia/mL, conidia were collected from a Petri dish containing 5-day-old *B. bassiana* and added to 600 mL sterile distilled water to a concentration of 1 x 10^6 conidia per mL. The preparation of treatment two (DE) consisted of diatomaceous earth 10 mg/mL in 600 mL sterile distilled water, 6 g of GOSA diatomaceous earth were added to obtain a concentration of 0.01 g/mL, and the mixture was vortexed with a Hermann® Vortex until a homogenized mixture was obtained. While for treatment three (Bbl), which was Immobilized *B. bassiana* 2% and 12 g of GOLDEN BELL® polyvinyl alcohol, was weighed and added to 600 mL of sterile distilled water contained in a 1 L flask, the solution was heated until the alcohol was dissolved and sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 min; once the solution was cold, *B. bassiana* conidia from a Petri dish were added and incubated for 5 days until a concentration of 1x10^6 conidia per mL was obtained, according to the methodology described by Barranco-Florido *et al*. (2009). For treatment four (Bb+DE), which consisted of *B. bassiana* 1 x 10^6 conidia/mL + diatomaceous earth 10 mg/mL, the combination of treatment one and treatment two was made, it was formulated as a 600 mL solution 1:1 contained in a 1L flask. Treatment five (Bbl+DE) consisted of immobilized *B. bassiana* 2 % + diatomaceous earth 10 mg/mL, a combination of treatment two and treatment three was formulated and a 600 mL solution 1:1 was contained in a 1L flask. Finally for the treatment six (Witness) 600 mL of sterile distilled water were used. The viability was determined in SDA following the methodology by Berlanga-Padilla and Hernández-Velázquez (2002) for all treatments that included conidia. In 5 different spots of a Petri dish (100 x 15 mm), a circle was marked with SDA agar, over which 2 µL of a 1 x 10^7 conidia/mL suspension was added, then coverslips were placed and after 24 h, the total number of conidia germinated in each spot was observed and registered using a Leyca DM750 microscope.

The *G. mellonella* and *P. brassicae* with *B. bassiana* larvae inoculation process consisted of two events: first, 60 last instar *G. mellonella* larvae were simultaneously placed on moist sterile paper towels and 140 x 20 mm Petri dishes and inoculated by aspersion with 3 L capacity TRUPER® sprinkler at 38 PSI for each treatment, plus 30 larvae with the same characteristics inoculated by immersion. For the second event, 90 last instar *P. brassicae* larvae were collected from a naturally infested cabbage crop and treatments were applied similarly to the *G. mellonella* larvae without immersion applications.

Damage in larvae cuticle

Damage percentage was evaluated at 24, 48, 72 and 120 h after inoculation, for this, the damage on the larvae cuticle was observed in a Leyca brand stereoscope. No damage in *P. brasicae* and *G. mellonella*, was observed, but cuticle melanization appeared.

Mortality of *G. mellonella and P. brassicae*

Mortality was evaluated at 24, 48, 72 and 120 hours after inoculation, values calculated and adjusted using the corrected mortality percentage formula (Abbott, 1925) to ensure normality and homogeneity of variances, then the data were subjected to analysis of variance (ANOVA).

Statistical Analysis

SAS version 9.0 for Windows 2008 was used with prior confirmation of normal data distribution. In the evaluation of the three diatomaceous earth brands, a factorial design was used to know the effect, with three simultaneous concentrations and a Tukey's multiple comparison test with $\alpha = 0.05$ to select the best one. In *G. mellonella*, an evaluation of the variability among treatments in cuticle damage and larval mortality was determined by a Tukey's multiple comparison test with $\alpha = 0.05$, and the relationship was determined by a Pearson's correlation coefficient between cuticle damage and the percentage of shapes found in each treatment. For the second evaluation with *P. brassicae*, it was determined if there was a significant variance in the percentage of dead larvae, and the best treatment was determined with a Tukey's mean comparison with $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Selection of diatomaceous earth by the shape and percentage damage to larval cuticle prior to experiment

Present shapes in terms of diatomaceous earth brand

There were four shapes of diatomaceous earth from the Gosa brand: Radial with rim (RB), radial shape without rim (RSB), meanwhile Echinocactus brand only one in rod shape (V), and other in ellipse shape (E) and the shape of Lombriz MX showed a lot of incomplete particles. The statistical analysis of shell shapes found showed significant differences ($P \leq 0.05$), radial with rim shape (RB), was found more frequently followed by radial shape without rim (RSB), this last one being different in its ellipse shape (E) at the same time, its mean was lower (Figure 1).

In addition, data analysis did not show significant differences between brands and diatomaceous earth-shell concentrations. Nevertheless, the Tukey test ($P \leq 0.05$) showed a greater amount of diatom shell shapes in the Echinocactus brand at 0.01 g/mL concentration, followed by the Gosa brand at 0.01 g/mL concentration, while the brand with the lower diatom shell shapes was Lombriz at 0.0001 g/mL concentration (Figure 2). It was also observed that as the particle concentration increases, the amount of shell shapes increases depending on the brand, as the concentration with the highest mean microalgae shell shape for all brands was 0.01 g/mL concentration, while the lowest mean was 0.001 g/mL concentration.

Diatomaceous earth damage on *G. mellonella* cuticle

The spots as a sign of damage by diatomaceous earth were found in greater amounts under the larvae abdomen. GOSA brand at 0.01 concentration caused 100 % of the spots on the cuticle of *G. mellonella* larvae, followed by Echinocactus brand at the same concentration with 77 %, while Lombriz-MX grand at 0.001 g/mL concentration caused 44 % of the damage (Table 1).

Nevertheless, the correlation analysis between the number of spots observed by microscope field and the percentage of shell shapes present per treatment, showed a weak positive correlation (0.768) between variables, with a determination coefficient of $R^2 = 0.59$ (Figure 3).

***G. mellonella* and *P. brassicae* with *B. bassiana* larvae inoculation and treatments effectiveness**

Damage in larvae cuticle

Statistical differences were found between treatments based on the number of spots found on *G. mellonella* ($P \leq 0.01$) (Figure 4). Bb+DE was the best treatment with a value of 7.22 spots found over the *G. mellonella* cuticle, followed by the polyvinyl alcohol immobilized *B. bassiana* treatment and the diatomaceous earth combination (Bbl+DE), while the minimum effective treatment was the TDS with a value of

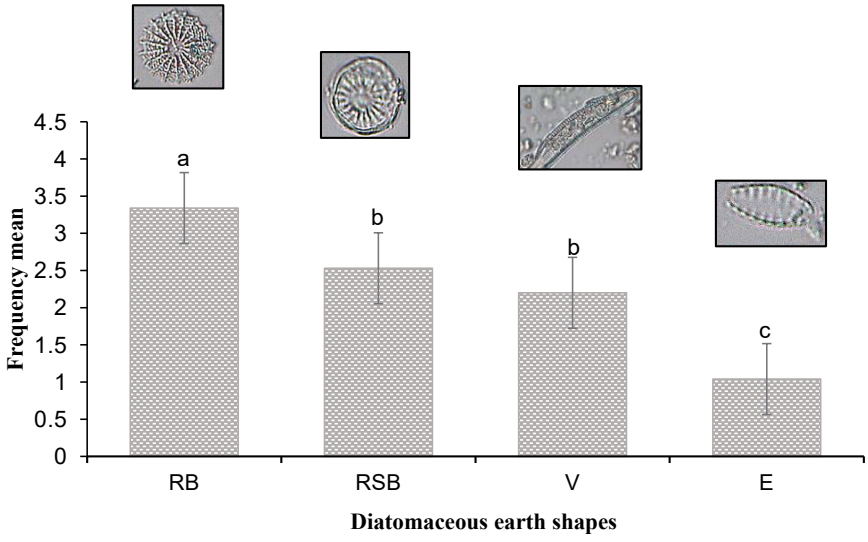


Figura 1. Frecuencia de formas de caparazones encontradas en tierra de diatomea. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). Radial con bordo (RB), Forma radial sin bordo (RSB), Forma de varilla (V), Forma de elipse (E).

Figure 1. Frequency of shell shapes found in diatomaceous earth. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). Radial with rim (RB), radial shape without rim (RSB), rod shape (V), ellipse shape (E).

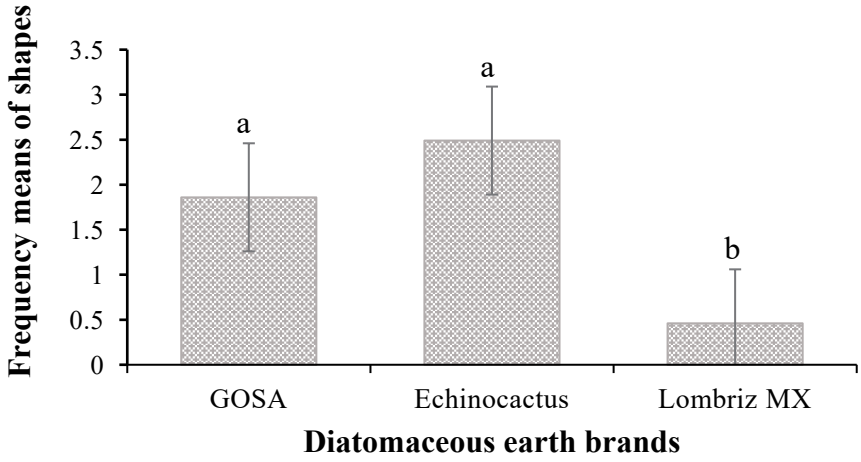


Figura 2. Número de formas de caparazones de algas de acuerdo con la maraca de tierra de diatomea. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.
Figure 2. Number of shell shapes according to the brand of diatomaceous earth. Means with the same letter are not significantly different (P ≤ 0.05).

Tabla 1. Porcentaje de daño sobre la cutícula de *G. mellonella* a 120 h.
Table 1. Percentage of damage on the *G. mellonella* cuticle at 120 h

Commercial brand	Concentration (g/mL)		
	0.01	0.002	0.001
GOSA©	100%	77%	66%
Echinocactus©	77%	75%	55%
Lombriz MX©	50%	55%	44%

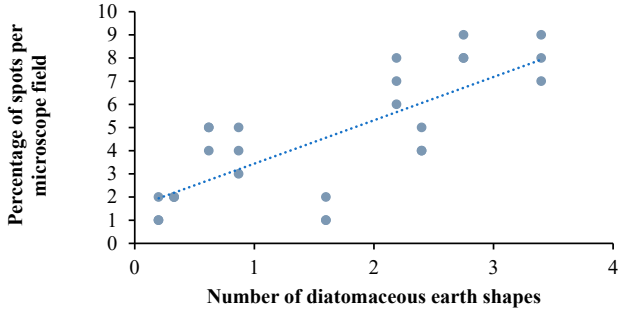


Figura 3. Correlación entre el número de formas de caparazones de algas entre marcas de tierra de diatomea y el porcentaje de manchas sobre la cutícula de *G. mellonella* cuticle. y = 1.8709x + 1.5705, R^2 = 0.5909.
Figure 3. Correlation between the number of shell shapes in three brands of diatomaceous earth and the percentage of spots on the *G. mellonella* cuticle. y = 1.8709x + 1.5705, R^2 = 0.5909.

4.56. Also, a significant difference was observed between the counting hours for the number of spots present (P ≤ 0.0001), and according to the comparison of Tukey means, the time that showed the greatest number of spots was at 72 h, as opposed to 24 and 48 h. It is worth mentioning that no spots were observed on *P. brassicae*.

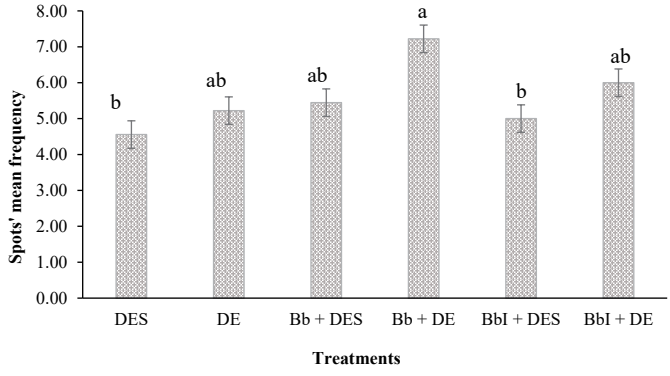


Figura 4. Media de frecuencia de número de manchas provocadas por el daño del tratamiento. Tratamientos a los cuales se les agrega una S fueron aplicados por el método de inmersión, mientras que los que no tienen S fueron aplicados por el método de aspersión. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P ≤ 0.05).
Figure 4. Mean frequency of spots caused by treatment damage. To specify that the treatments were applied by immersion, the letter S was added to the treatment key, otherwise, the treatments were applied by spraying. Means with the same letter are not significantly different (P ≤ 0.05).

Mortality of *G. mellonella and P. brassicae*

The treatment that caused the greatest mortality in *G. mellonella* was the solution of conidia in distilled water (Bb) through immersion application with 80 %, which was statistically different from the witness that registered 0 %, while the Bbl+DE treatment reached 40 % through the same application, although when changing the application method, this last treatment increased the larval mortality up to 60 %; at the same time, the best treatment was Bb through immersion method, but when the aspersion method was used, mortality decreased by 10 % (Figure 5).

The observations with *G. mellonella* in the aspersion application showed that the most effective treatment in *P. brassicae* was the Bbl+DE with a mortality percentage of 42

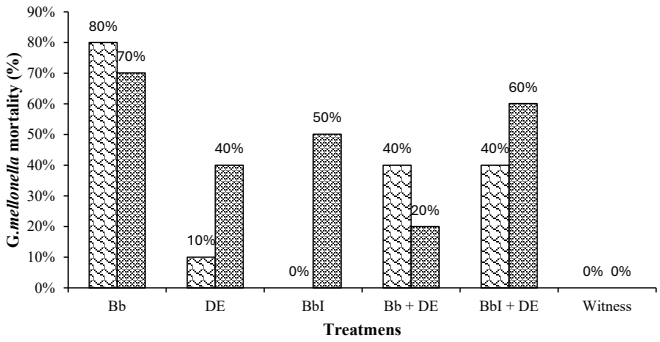


Figura 5. Porcentaje de mortalidad por efecto de los tratamientos en larvas de *G. mellonella* por diferentes métodos de inoculación. Tratamiento por inmersión (▨), tratamiento por aspersión (▩). *B. bassiana* 1x10 ^{6} conidia/mL (Bb), tierra de diatomea 1 mg/mL (TD), *B. bassiana* inmovilizada 6 % (BbI), *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidias/mL + tierra de diatomea 1 mg/ mL (Bb+TD).

Figure 5. Percentage of mortality due to the effect of the treatments on *G. mellonella* worm by different inoculation methods. Immersion treatment (▨), spray treatment (▩). *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidia/mL (Bb), diatomaceous earth 1 mg/mL (DE), immobilized *B. bassiana* 6 % (BbI), *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidia/mL + diatomaceous earth 1 mg/ mL (Bb+DE).

%, while the same treatment used in *G. mellonella* showed 18 % more mortality. On the other hand, the less effective treatment in both species was Bb+DE (Figure 6).

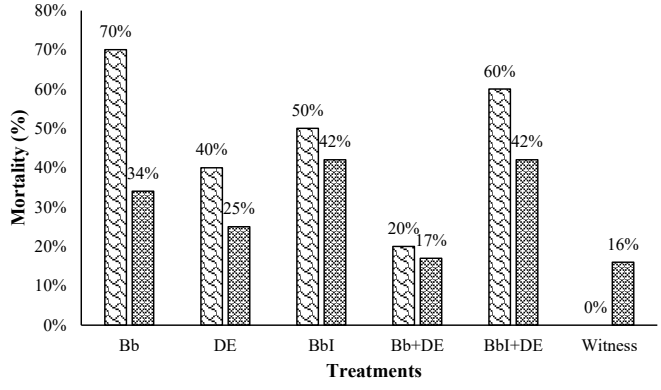


Figura 6. Mortalidad de *G. mellonella* y *P. brassicae* a 120h después de la inoculación por el método de aspersión. *G. mellonella* (▨),*P. brassicae* (▩). *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidia/mL (Bb), tierra de diatomacea 1 mg/mL (TD), *B. bassiana* inmovilizada en alcohol polivinilico 6 % (BbI), *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidias/mL + tierra de diatomea 1 mg/ mL (Bb+TD).

Figure 6. Mortality of *G. mellonella* and *P. brassicae* at 120h after inoculation by spray method. *G. mellonella* (▨), *P. brassicae* (▩). *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidia/mL (Bb), diatomaceous earth 1 mg/mL (DE), immobilized *B. bassiana* 6% (BbI), *B. bassiana* 1 x 10 ^{6} conidia/mL + diatomaceous earth 1 mg/ mL (Bb+DE).

DISCUSSION

According to the microalgae shell shapes from the diatomaceous earth brands, Colín-Garcia *et al*. (2013) indicate that shell patterns are specific and genetically determined, so there is a great variety of shapes in the diatomaceous earth. Hence, there will be greater or lesser effectiveness. Also, Natrass *et al*. (2015) mentioned that the shape variability shown in the diatomaceous earth also depends on the extraction site.

Moreover, regarding the results observed in the different brands of diatomaceous earth and at different concentrations, Arnaud *et al*. (2005) showed similar results when applying diatomaceous earth formulations at different concentrations, confirming that the higher the concentration, the greater the damage caused in the insect.

The correlation analysis between *G. mellonella* spots over the cuticle and the number of shapes present in the diatomaceous earth brand, suggests that the level of damage could also be related to other factors such as quality and purity (Reka *et al*., 2021), as declared by Alves *et al*. (2017) that at greater quality and purity, the effectiveness of diatomaceous earth is greater; in this case, the less pure earth was the one that caused less damage. Although it is not excluded that the shape of particles confirming the diatomaceous earth is related to the damage to the insect cuticule, since it has been observed that the shells with acute shape cause greater damage (Zeni *et al*., 2021; Korunic, 2013), in this study there was a low presence of acute shapes and a greater predominance of radial shapes that could have interfered with the damage percentage; in this regard, Korunic (1998) stated that the effectiveness is related to the contact established between the radial particle surface and the insect cuticule; the more uniform the surface, the greater will be the cuticle adhesion.

According to the results, the damage effectiveness of the treatments over the *G. mellonella* larvae cuticle showed a lower effect with the treatment with diatomaceous earth and *B. bassiana* immobilized in polyvinyl alcohol; Liauw *et al*. (2020) and Angeli *et al*. (2022) mention that polyvinyl alcohol prevents contact between the spore surface and the diatomaceous earth particles, avoiding its function over the insect cuticle when a liquid is applied. Although these authors also mention that dry encapsulation has shown good results in adhesion and conidia retention on surfaces, these formulations promote the abrasive action of the diatomaceous earth particles without being trapped in the liquid formulations. Thus, the treatment with the best results was *B. bassiana* + diatomaceous earth applied by aspersion. According to Wakil *et al*. (2021) and Zeni *et al*. (2021), in these applications, the particles have a greater possibility to touch the insect, and those that are above the surfaces, can be picked up more easily by the insect, unlike the immersion application where only the particles adhered to the insect body will act; besides in immersion applications, there is less time for the particles to adhere to larvae cuticle when submerged in and out of the solution very quickly (Abdou *et al*., 2022), the time is essential to obtain better results. For example, in this study the time showing greater number of spots was at 72 h, although the damage in the insect cuticule also depends on the species, since in this case there were no spots on *P. brassicae* cuticule.

The mortality effectiveness of water-diluted *B. bassiana* has been well documented, unlike for spores covered with polyvinyl alcohol (Ozdemir *et al*., 2020) both in *G. mellonella* and *P. brassicae*, although Nazzaro *et al*. (2012) reported the advantages of polyvinyl alcohol used as an alternative covering material, such as fungal conidia, in which it prolongs

its useful life (Wenzel *et al*., 2017). Although in this case, the treatment with immobilized *B. bassiana* in polyvinyl alcohol flasks along with diatomaceous earth (T5) did not cause the expected efficacy when applied by immersion, it has to be considered that the efficacy also depends on the formulation applied. Therefore, additional tests are suggested with *B. bassiana* spores covered with polyvinyl alcohol powder formulated and applied to *G. mellonella* and *P. brassicae*.

The results also showed that, in addition to obtaining a different effect with the treatment and application, the larval mortality effectiveness is related to the larval species susceptibility that receives the treatment as mentioned by Korunic (1998; 2013), with the possible retention of diatomaceous earth particles and *B. bassiana* spores inside the polyvinyl alcohol flask which does not allow them to act in applications by immersion and aspersion. Although, the lack of previous studies on the effectiveness of *B. bassiana* and immobilized diatomaceous earth in polyvinyl alcohol to reinforce these results make it difficult to draw convincing conclusions.

CONCLUSIONS

In this study, the amount and shape of the algal shells present in the diatomaceous earth was observed to cause damage to the *G. mellonella* cuticle; therefore, when using high-purity diatomaceous earth products, efficacy is assured. Also, when immobilizing *B. bassiana* conidia in polyvinyl alcohol vials with diatomaceous earth particles, direct contact of both with the surfaces where they are applied should be avoided, since the effect is less than that observed when applying only *B. bassiana* conidia diluted in water. The above could be show with scanning microscope images, however, there was the limitation of not having the equipment. In adition, it is necessary to work on studies with polyvinyl alcohol powder formulations covering the conidia, leaving the diatomaceous earth particles free to exert their abrasive action on the insect cuticle. It is also suggested to carry out an additional study with at least two species of insects to better detect the effect of the treatments and to obtain reliable results, and decide if the application of these treatments can be made by aspersion or by immersion, since a high concentration of alcohol dissolved in water could limit the aspersion success.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia and Tecnología (CONAHCyT) for the financial support granted to the first author during the graduate studies in the Potential Phyto-Genetic Agricultural Resources Master's Degree.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is a non-existing conflict of interest.

REFERENCES

Abbas, W., Javed, N., Haq, I. U., and Ahmed, S. 2021. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes against cabbage butterfly (*Pieris brassicae*) Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) in laboratory conditions. International Journal of Tropical Insect Science. 41(1): 525-531.

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18 (2): 265-267.

Abdou, M. A., Ahmed, S. S., and Zyaan, O. H. 2022. Efficacy of two entomopathogenic fungi in combination with diatomaceous earth against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology. 15(4): 155-169.

Alves, L. F., Martins, C., Nardelli, M., and Alves, V. 2017. In vitro assay and morphological characterization of a new product based on diatomaceous earth for lesser mealworm control in poultry houses. Arquivos Do Instituto Biológico. 84: 1-6, e0782015.

Angeli, L. F., Pinto, D. G., and Barbosa, R. 2022. Liquid preparation of diatomaceous earth against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Arquivos Do Instituto Biológico, 89: 1-9, e00032022.

Arnaud, L., Tran Thi Lan, H., Brostaux, Y., and Haubruge, E. 2005. Efficacy of diatomaceous earth formulations admixed with grain against populations of *Tribolium castaneum*. Journal of Stored Products Research, 41(2): 121-130.

Azamar-Jiménez, I. J. 2018. Encapsulación de *Beauveria bassiana* en biomateriales a base de polímeros. Universidad del papaloapan. Available in: https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB33-_AZAMAR_JIMENEZ_IVONNE_JANETH.pdf

Bacca, T., and Lagos, T. C. 2014. Efecto de *Beauveria bassiana* y del entomonematodo *Steinernema* sp. sobre larvas de *Galleria mellonella*. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural, 18(1): 247-258.

Bachrouch, O., Nefzi, H., Belloumi, S., Horchani-Naifer, K., Sriti Eljazi, J., Haoual Hamdi, S., Msaada, K., Labidi, J., Abderrabba, M., and Mediouni Ben Jemaa, J. 2022. Insecticidal effects of two Tunisian diatomaceous earth loaded with *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans and Links as an ecofriendly approach for stored coleopteran pest control. International Journal of Environmental Health Research. 33(4): 1-15.

Barranco-Florido, E., Bustamante-Camilo, P., Mayorga-Reyes, L., González-Cervantes, R., Martínez-Cruz, P., and Azaola, A. 2009. B-n-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium* (Verticillium) *lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. Interciencia, 34(5): 356-360.

Berlanga-Padilla, A. M. and Hernández-Velázquez, V. H. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M. a. Var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. Manejo Integrado de Plagas, 63(1): 51-55.

Castro, J. A., Castillo, F. A., and Torres, Y. S. 2022. Organic agriculture in mexico: A challenge for sustainability and its international commercialization. *Revista Do CEDS*, 2(11). available in: https://periodicos.undb.edu.br/index.php/ceds/article/view/51

Colín-García, M., Heredia, A., and Dos Santos, C. 2013. Sílice de las algas diatomeas (Clase Bacillariophyceae) como material complejo y su importancia nanotecnológica. La Granja. Revista de Ciencias de la Vida. 17(1): 5-15.

Del Puerto, A. M., Suárez Tamayo, S., and Palacio Estrada, D. E. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 52(3): 372-387.

Korunic, Z. 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. Journal of Stored Products Research. 34(2): 87-97.

Korunic, Z. 2013. Diatomaceous earths—Natural insecticides. Pesticidii fitomedicina. 28(2): 77-95.

Liauw, C. M., Slate, A. J., Butler, J. A., Wilson-Nieuwenhuis, J. S. T., Deisenroth, T., Preuss, A., Verran, J., and Whitehead, K. A. 2020. The effect of surface hydrophobicity on the attachment of fungal conidia to substrates of polyvinyl acetate and polyvinyl alcohol. Journal of Polymers and the Environment. 28(5): 1450-1464.

Litwin, A., Nowak, M., and Różalska, S. 2020. Entomopathogenic fungi: Unconventional applications. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 19(1): 23-42.

Losic, D., and Korunic, Z. 2018. Diatomaceous earth, a natural insecticide for stored grain protection: Recent progress and perspectives. RSC Nanoscience and Nanotechnology. 44(1): 219-247.

Mujica, Y., Martínez, M. de los A., Alemán, J., and Ravelo, J. 2009. Fluctuación poblacional de plagas de la col (*Brassica oleracea*) y otros enemigos naturales en dos agroecosistemas. Cultivos Tropicales. 30(4): 00-00.

Nattrass, C., Horwell, C., Damby, D., Kermanizadeh, A., Brown, D., and Stone, V. 2015. The global variability of diatomaceous earth toxicity: A physicochemical and *in vitro* investigation. Journal of Occupational Medicine and Toxicology. 10(1): 1-23.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., and Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 23(2): 182-186.

Ozdemir, I. O., Tuncer, C., Erper, I., and Kushiyev, R. 2020. Efficacy of the entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30(24): 1-5

Pacheco, M. de L., Reséndiz, J. F., and Arriola, V. J. 2019. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: Una revisión. Revista mexicana de ciencias forestales. 10(56): 4-32.

Reka, A. A., Pavlovski, B., Fazlija, E., Berisha, A., Pacarizi, M., Daghmehchi, M., Sacalis, C., Jovanovski, G., Makreski, P., and Oral, A. 2021. Diatomaceous earth: Characterization, thermal modification, and application. Open Chemistry. 19(1): 451-461.

SAS System Viewer software. 2008. Available in: https://sas-system.updatestar.com/es

Schwentesius, R., and Gómez, L. 2015. Organic agriculture in Mexico and its contributions to sustainable development. 20(1). Available in: https://www.researchgate.net/publication/288503743_Organic_Agriculture_in_Mexico_and_its_Contributions_to_Sustainable_Development

SIAP. 2019. Reporte Col (repollo) [SIACON]. Available in: https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430.

Vargas-Flores, M. E. 2003. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea* sp. (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Doctorado en ciencias. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Wakil, W., Schmitt, T., and Kavallieratos, N. 2021. Persistence and efficacy of enhanced diatomaceous earth, imidacloprid, and *Beauveria bassiana* against three coleopteran and one psocid stored-grain insects. Environmental Science and Pollution Research. 28: 23459-23472.

Wang, C., and Wang, S. 2017. Insect pathogenic fungi: Genomics, molecular interactions, and genetic improvements. Annual Review of Entomology. 62(1): 73-90.

Wenzel, I. M. W., Batista, A., Giordano, I. B., Denadae, B. E., Fernandes, J. B., and Forim, M. R. 2017. Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. Acta Scientiarum. Agronomy. 39(4): 457-464.

Willer, H. 2021. The world of organic agriculture. FAO. Available in: http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/1378841/

Zeni, V., Baliota, G. V., Benelli, G., Canale, A., and Athanassiou, C. G. 2021. Diatomaceous earth for arthropod pest control: Back to the future. Molecules. 26(24): 7487

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Allelopathic activity of aqueous extracts of arboreal species on the germination and initial growth of two weeds

Actividad alelopática de extractos acuosos de especies arbóreas sobre la germinación y crecimiento inicial de dos malezas

Victor Gabriel Almada Ruiz[1], Álvaro Reyes Olivas[1], Gabriel Antonio Lugo García[1], Laura Delia Ortega Arenas[2], Celia Selene Romero Félix[1] and Bardo Heleodoro Sánchez Soto[1,3*] ✉

[1] Universidad Autónoma de Sinaloa, Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Calle 16 y Avenida Japaraqui, C.P. 81110. Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México.
[2] Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, México.
[3] Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Blvd. Macario Gaxiola y Carretera Internacional México 15, C.P. 81223 Los Mochis, Sinaloa.

ABSTRACT

In the search for sustainable management options for the weeds *Convolvulus arvensis* L. and *Portulaca oleracea* L., we evaluated the *in vitro* inhibitory potential in germination and initial growth of the aqueous extract of the fruit, leaf and bark, of the arboreal species with allelopathic characteristics *Eucalyptus globulus* Labill. and *Schinus terebinthifolia* Raddi. The germination and growth inhibition was evaluated by exposing seeds of *C. arvensis* and *P. oleracea*, arranged inside a Petri dish, to the spray of the extract at different concentrations. The fruit and leaf extracts of *S. terebinthifolius*, as well as that of the *E. globulus* leaf, inhibited the germination and growth of both weeds from the 2.5 % formulation. The biological activity of the extracts was positively related to the concentration. These results suggest that tree extracts represent a useful tool in the agroecological management of the two weeds.

Keywords: Allelopathy, *Convolvulus arvensis*, *Eucalyptus globulus*, *Portulaca oleracea*, *Schinus terebinthifolius*.

RESUMEN

En la búsqueda de opciones sostenibles de manejo de las malezas *Convolvulus arvensis* L. y *Portulaca oleracea* L., se evaluó *in vitro* el potencial de inhibición de germinación y crecimiento inicial del extracto acuoso de fruto, hoja y corteza de las especies arbóreas, con características alelopáticas, *Eucalyptus globulus* Labill. y *Schinus terebinthifolius* Raddi. La inhibición de germinación y crecimiento se evaluó al exponer semillas de *C. arvensis* y *P. oleracea* dispuestas dentro de una caja Petri, a la aspersión del extracto a diferentes concentraciones. Los extractos de fruto y hoja de *S. terebinthifolius*, así como el de hoja de *E. globulus*, inhibieron la germinación y crecimiento de ambas malezas a partir del formulado al 2.5 %. La actividad biológica de los extractos se relacionó positivamente con la concentración. Los resultados sugieren que los extractos de las arbóreas representan una herramienta útil en el manejo agroecológico de las malezas

Palabras clave: Alelopatía, *Convolvulus arvensis*, *Eucalyptus globulus*, *Portulaca oleracea*, *Schinus terebinthifolius*.

*Author for correspondence: Bardo Heleodoro Sánchez Soto
e-mail: bardosanchez@hotmail.com
Received: March 15, 2023
Accepted: August 15, 2024
Published: September 17, 2024

INTRODUCTION

Convolvulus arvensis L. (Convolvulaceae) and *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) are among the most harmful weeds to agriculture in Mexico (Espinoza and Villaseñor, 2017; Carrascosa *et al*., 2023). The specie *C. arvensis,* also known as bindweed, is a creeping habit plant with a high colonizing and regenerative potential, turning it into a serious problem in northwestern Mexico (Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Sinaloa y Sonora), where reduces by 40 - 50 % the production of Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) (Solanaceae), chickpea (*Cicer arietinum* L.) (Fabaceae) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae), widely growth crops in the region (Rodríguez *et al*., 2015; Tamayo *et al*., 2021; Ávila, 2022). Similarly, *P. oleracea*, commonly named as purslane, maintains a strong competition with horticultural crops, such as pepper (*C. annuum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) (Solanaceae), where depending on its population density and the association it maintains with other species, reduces fruit production down by 96 % (Blanco *et al*., 2018).

Among the methods for managing these and other weeds is the use of chemical products; however, its use has generated environmental and public health problems, encouraging the search for technology based on sustainability. One of the strategies with the greatest projection and history of success in agriculture, is the use of plants with allelopathic properties (Galán, 2023). In this regard, the genus *Eucalyptus* (Myrtaceae) highlight as one of the main exponents of this characteristic, mainly due to the secretion of different essential oils (Barbosa *et al*., 2016), substances whose interference in the seed germination process has been observated in species such as *Amaranthus retroflexus* L. (Amaranthaceae), *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Poaceae) and *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) (González, 2017; Puig *et al*., 2018). With similar characteristics is *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae), a species rich in monoterpenes and sesquiterpenes, with a record of interference in the germination of *Eucalyptus camaldulensis* Denham (Myrtaceae), *Eragrostis plana* Nees (Poaceae) and *Urochloa brizantha* (A.Rich.) R.D. Webster (Poa-

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1992

ceae) (Maldaner *et al*., 2020; Fernandes *et al*., 2023).

Given the need to contribute with information on species with allelopathic potential, as well as weeds susceptible to them, this study aimed to evaluate the *in vitro* effect of aqueous extracts of *E. globulus* and *S. terebinthifolius* on the germination and initial growth of the weeds *C. arvensis* and *P. oleracea*.

MATERIALS AND METHODS

This research was carried out at the "Carlos Darwin" Herbarium of the Faculty of Agriculture of Valle del Fuerte, attached to the Autonomous Universidad Autónoma de Sinaloa, from August 2021 to October 2022. The samples of *E. globulus* and *S. terebenthifolius* were obtained from natural vegetation located on the border of the municipalities of Ahome and El Fuerte, Sinaloa, Mexico (25°51'39"N and 108°57'27"W), an area characterized by a warm semi-dry climate, with an average temperature between 24 - 26 °C and maximum rainfall of 700 mm per year (Cortés *et al*., 2013). Weed seeds were obtained from plants developed in agricultural crops in the area. To corroborate the taxonomic identity of the plants, representative samples were collected, based on what was described by Sánchez and González (2007). Taxonomic identification was determined by the staff assigned to the Herbarium.

Preparation of extracts

The fresh material (4.7 kg) was separated by leaf, fruit and bark structures, and was left to dry for 15 d in the shade at a room temperature of 28 ± 2 °C. Each plant structure was ground with the help of a grain mill (Estrella®). The powder obtained was weighed in portions of 2.5, 5, 7.5, 10, 15 and 20 g, incorported separately into amber-colored flasks and mixed with 100 mL of distilled water (w/v) (Ávalos *et al*., 2019). The colloid was stored in the dark at 25 ± 2 °C. After 24 h, it was filtered through Whatman # 40 paper and deposited in 100 mL polyethylene bottles, each solution making up a treatment: T2 (2.5 %), T3 (5.0 %), T4 (7.5 %), T5 (10.0 %), T6 (15.0 %) and T7 (20.0 %). A control treatment to which only distilled water was applied (T1= 0 %) was included. The breaking of dormancy in *C. arvensis* seeds was achieved by previous treatment based on sulfuric acid, according to Amani *et al*. (2015). Because dormancy was not observed in *P. oleracea*, no pre-germination procedure was necessary. The seeds of both species were sterilized for 5 min in a commercial chlorine solution (Cloralex®) and distilled water (1:10), with subsequent washing to eliminate residues of the chemical solution.

Bioassay

Germination and growth inhibition was evaluated according to Xuan *et al*. (2004). It consisted of placing 25 weed seeds on interfolded (Kimberly-Clark®) paper arranged in 10 cm diameter Petri dishes. Afterwards, the seeds were sprinkled with 7 mL of the corresponding treatment, sealed with Parafilm paper, and placed inside a Cooling Incubator Model IRH-150F germination chamber with a photoperiod of 16:8 h and a temperature of 30 ± 0.5 °C. The effect of the treatments on the germination of the seeds was measured every 24 h for a period of 14 d through the response variables, initial time of germination (ITG), mean germination time (T_{50}), initial percentage of germination (IPG), and final percentage of germination (FPG), while the initial growth of the seedlings was evaluated with the total length (TL) of the shoot, in both species, and the hypocotyl length (HL) and radicle lenght (RL) alone in *P. oleracea*.

Experimental design and data analysis

The experiment was established through three independent bioassays, under a completely randomized design. In each bioassay, seven treatments with four repetitions (25 seeds/replication) were used. The response variables did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variances, so the data was subject to a non-parametric analysis using the Kruskal-Wallis test with Pearson's χ^2 statistic ($p < 0.05$), and then to a test of multiple comparison of means using the Wilcoxon Rank Sum test at 5 % with the statistical program SAS online (SAS® OnDemand For Academics).

RESULTS AND DISCUSSION

In general, the weeds *Convolvulus arvensis* and *Portulaca oleracea* were susceptible to the extracts of the evaluated arboreal species, although this varied depending on the species, structure and concentration. The extracts of *S. terebinthifolius* were found to be more effective than those of *E. globulus* ($p < 0.05$), and *P. oleraceae* showed greater susceptibility than *C. arvensis*.

Germination

The 94.7 % of *E. globulus* formulations, did not show a significant effect ($p < 0.05$) on the ITG of the evaluated weeds (Figure 1). Twenty percent of treatment placed the ITG of *C. arvensis* in 2.7 ± 1.2 d (d), while 15 % of treatment delayed the germination of *P. oleracea* until 12.0 ± 6.0 d. Regarding T_{50}, leaf and fruit structures were a highlight since delayed the germination of 50 % of the *C. arvensis* seed population at concentrations between 5 to 20 %, in a lapse of 7.92 ± 0.0 y 9.68 ± 0.2 d; meanwhile, on *P. oleracea* (T_{50} = 13.38 ± 3.2 d) the leaf extract did so at a concentration of 15 % (Figure 1). In this sense, Kandhro *et al*. (2016) found a suppressive effect on the germination of *C. arvensis* with the application of aqueous extracts of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., behavior emulated by *P. oleracea*, where although germination is affected depending on the concentration used, the interaction of the components occurs at a lower level than expected, translating the inhibitory effect into a temporary deficit at the beginning of the process. In both cases, this situation may be due to the release of phenolic, benzoic, cinnamic acids, flavonoids, tannins and other substances, whose transfer to the target species induces the modification of the normal germination and growth mechanism of the plant (Pinto *et al*., 2021; Shahzad *et al*., 2023).

Similarly to *E. globulus*, 36.8 and 26.3 % extracts of *S. terebenthifolius* expressed a significant delay ($p < 0.05$) in the

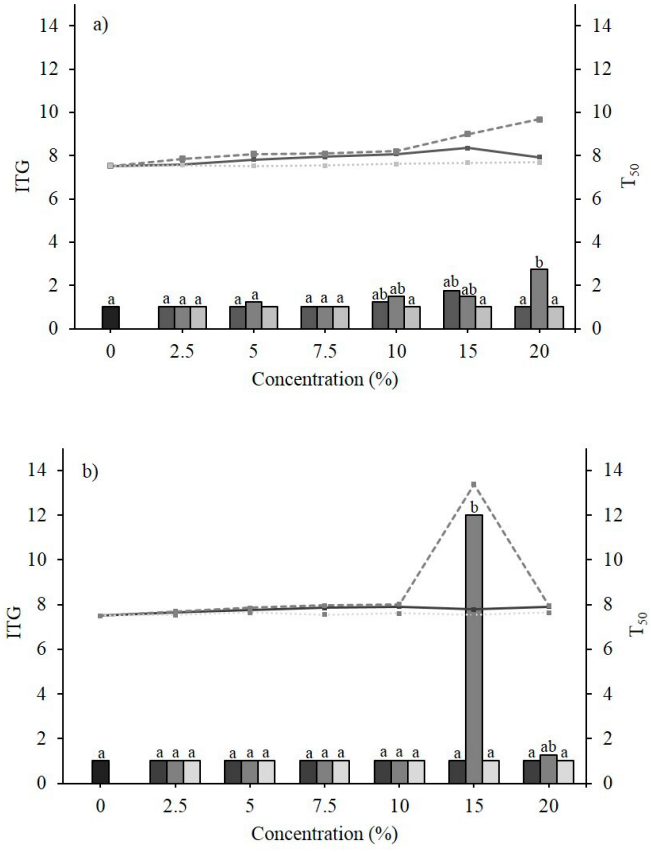


Figura 1. Medias del tiempo inicial (TIG) y tiempo medio de germinación (T_{50}) de semillas de a) *Convolvulus arvensis* L. y b) *Portulaca oleracea* L., tratadas con extractos acuosos a distintas concentraciones de fruto (—), hoja (---) y corteza (···) de *Eucalyptus globulus* Labill. Los colores de las barras y líneas se corresponden al orden presentado para las estructuras utilizadas de cada planta.

Figure 1. Means of the initial time (ITG) and mean germination time (T_{50}) of the seeds of a) *Convolvulus arvensis* L. and b) *Portulaca oleracea* L., treated with aqueous extracts at different concentrations of the fruit (—), leaf (---) and bark (···) structures of *Eucalyptus globulus* Labill. The colors of the bars and lines correspond to the order presented for the structures used on each plant.

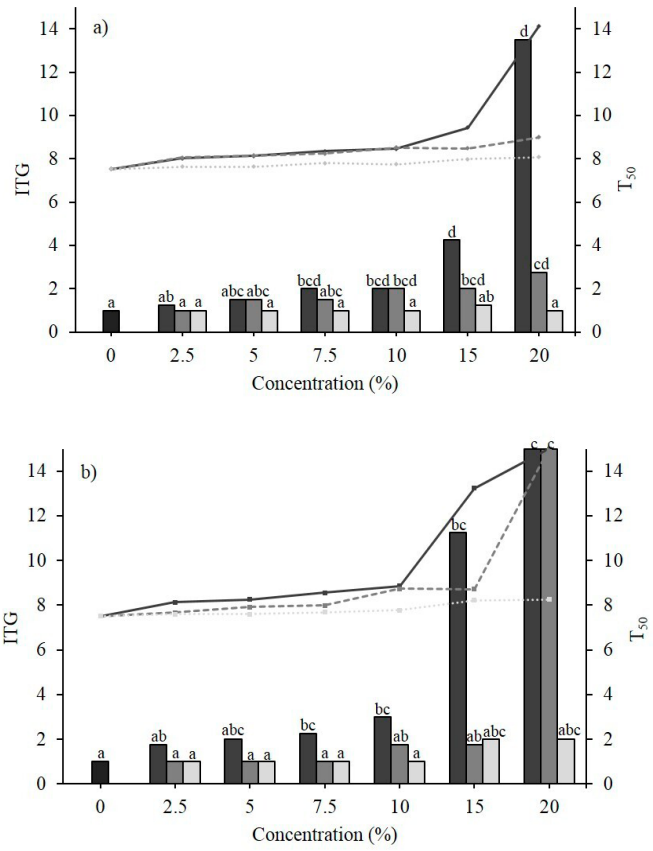


Figura 2. Medias del tiempo inicial (TIG) y tiempo medio de germinación (T_{50}) de semillas de a) *Convolvulus arvensis* L. y b) *Portulaca oleracea* L., tratadas con extractos acuosos a distintas concentraciones de fruto (—), hoja (---) y corteza (···) de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Los colores de las barras y líneas se corresponden al orden presentado para las estructuras utilizadas de cada planta.

Figure 2. Means of the initial time (ITG) and mean germination time (T_{50}) of the seeds of a) *Convolvulus arvensis* L. and b) *Portulaca oleracea* L., treated with aqueous extracts at different concentrations of the fruit (—), leaf (---) and bark (···) structures of *Schinus terebinthifolius* Raddi. The colors of the bars and lines correspond to the order presented for the structures used on each plant.

germination onset times of *C. arvensis* and *P. oleracea,* respectively (Figure 2). Both species were susceptible to fruit extract concentrations of 7.5 %, and reached their greatest time lag with the leaf and/or fruit structure formulations at 20 %. *C. arvensis* registered a significant minimum ITG of 2.0 ± 0.0 d and a maximum of 13.5 ± 3.0 d, while *P. oleracea* observed a delay between 2.0 ± 0.0 d and 15.0 ± 0.0 d. The T_{50} of both species showed significant differences ($p < 0.05$) when using the leaf, fruit or bark structure extracts. With an amplitude between 8.13 ± 0.0 and 14.1 ± 1.7 d, *C. arvensis* responded negatively to the fruit and leaf extracts at 5 %, while *P. oleracea* responded negatively to fruit (2.5 - 20 %), leaf (10 - 20 %) and bark (15 - 20 %) extracts, all with a ITG>8.13 ± 0.0 d.

The allelopathic activity of the genus *Schinus* has been documented in the germination of cultivated and unwanted species (Bañuelas, 2019; Nunes *et al*., 2019). In termination experiments of *L. sativa,* Bündchen *et al*. (2015) observed a similar behavior, where the concentration of the aqueous leaves extracts delays in 5 % the germination process, even when the final percentage (70 %) does not present significant differences ($p < 0.05$) with respect to the control (75 %). This delay is part of a dose-dependent relationship observed in species such as *Gledtschia amorphoides* Taub, where an increase in T_{50} and a decrease in germination speed were recorded as a function of the concentration of *Schinus* leaves aqueous extract (Buturi *et al*., 2015). The aqueous extracts of *E. globulus* significantly ($p < 0.05$) reduced the germination percentages of *C. arvensis* and *P. oleracea*. As germination inhibitor extracts, the leaf formulations at 15 - 20 % stood out ($p < 0.05$), observing greater susceptibility of *P. oleracea* (FPG ≤ 17.0 ± 3.8 %) with respect to *C. arvensis* (FPG ≤ 38.0 ± 9.5 %) (Table 1). This situation responds to the abundance of phenolic compounds in the extracts of *Eucalyptus*, whose interaction with the recipient organisms results in interference with the cell division and growth processes (El-Ghit and Hanan, 2016; Morsi and Abdelmigid, 2016; González, 2017). However, a close relationship is observed between the concentration and the capacity of the extract to completely inhibit the FPG

Tabla 1. Promedios del porcentaje inicial (PIG) y final (PFG) de germinación de semillas de *Convolvulus arvensis* L. y *Portulaca oleracea* L. tratadas con extractos acuosos a distintas concentraciones de fruto, hoja y corteza de *Eucalyptus globulus* Labill. y *Schinus terebenthifolius* Raddi.
Table 1. Means of the initial (IPG) and final (FPG) percentage of germination of *Convolvulus arvensis* L. and *Portulaca oleracea* L. seeds, treated with aqueous extracts at different concentrations of the fruit, leaf and bark structures of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Schinus terebenthifolius* Raddi.

Arvense species	Concentration (%)	Structure	Arboreal species			
			Eucalyptus globulus		*Schinus terebenthifolius*	
			IPG	FPG	IPG	FPG
Convolvulus arvensis	0	Fruit	64.0±8.6^{a}	95.0±3.8^{abc}	64.0±12.6^{bc}	96.0±0.0^{a}
	2.5		73.0±13.6^{abcd}	89.0±6.0^{abc}	22.0±28.5^{defg}	69.5±40.7^{abcdef}
	5		32.0±13.4^{cdefg}	88.0±6.5^{abcde}	33.0±33.5^{cdef}	79.0±3.8^{cdefgh}
	7.5		17.0±5.0^{defg}	89.0±12.3^{abc}	42.0±18.0^{abcde}	88.0±8.6^{abcde}
	10		21.0±28.9^{fg}	81.0±8.2^{cdefg}	26.0±2.3^{cdef}	83.0±7.5^{abcdefg}
	15		39.0±33.5^{bcdefg}	91.0±5.0^{abc}	5.0±2.0^{fg}	8.0±3.2^{fg}
	20		15.0±3.8^{efg}	84.0±3.2^{bcdef}	1.0±2.0^{g}	1.0±2.0^{g}
	2.5	Leaf	26.0±12.4^{defg}	78.0±2.3^{efg}	15.0±10.0^{defg}	87.0±10.0^{abcde}
	5		21.0±28.9^{fg}	87.0±8.8^{abcde}	36.0±36.9^{bcdef}	92.0±3.2^{abc}
	7.5		7.0±3.8^{g}	86.0±4.0^{abcdef}	33.0±33.8^{cdef}	84.0±8.0^{abcdef}
	10		20.0±19.6^{efg}	75.0±10.5^{defg}	34.0±7.6^{abcdef}	81.0±9.4^{bcdefg}
	15		9.0±6.0^{g}	72.0±6.5^{fg}	19.0±11.0^{cdefg}	75.0±2.0^{efgh}
	20		6.0±4.0^{g}	38.0±9.5^{g}	14.0±12.4^{defg}	52.0±8.6^{fgh}
	2.5	Bark	84.0±8.6^{abc}	88.0±5.6^{abcde}	74.0±8.3^{a}	95.0±5.0^{ab}
	5		92.0±5.1^{ab}	93.0±5.0^{ab}	75.0±12.3^{ab}	94.0±5.1^{ab}
	7.5		84.0±5.6^{ab}	88.0±3.2^{abcd}	51.0±15.4^{abcd}	93.0±6.8^{abc}
	10		67.0±5.0^{abcde}	84.0±5.6^{bcdef}	50.0±7.6^{abcd}	91.0±6.8^{abcd}
	15		64.0±8.6^{abcdef}	84.0±8.6^{abcdef}	27.0±30.5^{cdef}	79.0±5.0^{cdefgh}
	20		54.0±12.4^{abcdef}	83.0±3.8^{bcdefg}	6.0±2.3^{efg}	74.0±9.5^{defgh}
	p<0.05		<0.0001	0.0006	0.0002	<0.0001
Portulaca oleracea	0	Fruit	98.0±2.3^{a}	98.0±2.3^{ab}	72.0±15.3^{ab}	100.0±0.0^{a}
	2.5		67.0±8.8^{abcde}	98.0±4.0^{ab}	58.0±37.0^{abcd}	99.0±2.0^{ab}
	5		48.0±7.3^{bcdefg}	99.0±2.0^{ab}	49.0±19.7^{abcde}	99.0±2.0^{ab}
	7.5		28.0±9.8^{defgh}	98.0±2.3^{ab}	26.0±41.3^{bcdef}	100.0±0.0^{a}
	10		19.0±3.8^{efgh}	96.0±3.2^{sbcd}	33.0±14.0^{bcdef}	98.0±2.3^{ab}
	15		40.0±8.6^{cdefgh}	99.0±2.0^{ab}	2.0±2.3^{f}	4.0±5.6^{c}
	20		49.0±13.2^{bcdefg}	99.0±2.0^{ab}	0.0±0.0^{f}	0.0±0.0^{c}
	2.5	Leaf	58.0±10.5^{abcdef}	100.0±0.0^{a}	67.0±11.9^{abc}	98.0±2.3^{ab}
	5		27.0±6.8^{defgh}	100.0±0.0^{a}	21.0±2.0^{cdef}	99.0±2.0^{ab}
	7.5		16.0±6.5^{fgh}	97.0±3.8^{abc}	11.0±6.0^{ef}	99.0±2.0^{ab}
	10		12.0±5.6^{gh}	98.0±4.0^{ab}	14.0±6.9^{def}	98.0±4.0^{ab}
	15		1.0±2.0^{h}	1.0±2.0^{d}	23.0±14.3^{cdef}	94.0±4.0^{c}
	20		8.0±4.6^{gh}	17.0±3.8^{cd}	0.0±0.0^{f}	0.0±0.0^{c}
	2.5	Bark	93.0±11.4^{a}	100.0±0.0^{a}	82.0±6.9^{a}	100.0±0.0^{a}
	5		90.0±4.0^{ab}	99.0±2.0^{ab}	78.0±2.3^{a}	98.0±2.3^{ab}
	7.5		87.0±8.2^{zbc}	98.0±2.3^{ab}	64.0±9.8^{abcd}	100.0±0.0^{a}
	10		83.0±11.0^{abc}	100.0±0.0^{a}	48.0±19.8^{abcde}	99.0±2.0^{ab}
	15		89.0±12.3^{ab}	94.0±7.6^{abcd}	67.0±6.8^{abc}	99.0±2.0^{ab}
	20		72.0±8.0^{abcd}	92.0±5.6^{bcd}	57.0±10.5^{abcde}	91.0±6.0^{bc}
	p<0.05		<0.0001	0.0013	<0.0001	<0.0001

of weeds, with 89.4 % of the treatments losing their effectiveness at the end of the experiment; probably due to the degradation of the compounds at a lower concentration in the aqueous formulation, and whose residence period does not exceed five days (Sáez, 2019; Pinto *et al*., 2021).

With a similar pattern, the fruit and leaf formulations of *S. terebinthifolius* significantly reduces ($p < 0.05$) the IPG of both weeds. As observed in Table 1, the initial germination of *P. oleracea* showed a greater susceptibility to the extracts, expressing a negative response with the 36.8 % of treatments, while *C. arvensis* did so with 31.0 %. In both displays, the IPG was less than or equal to 23.0 ± 14.3 %. This register increased substantially when calculating the FPG. The differentiation between treatments ($p < 0.05$), showed effective in those treatments with germination lower than 81.0 ± 9.4 and 91.0 ± 6.0 %, for *C. arvensis* and *P. oleracea*, respectively. The fruit

extracts at 15 and 20 % stood out with a FPG ≤ 8.0 ± 3.2 %, highlighting the inability of *P. oleracea* to germinate with the concentrate at 20 %. This situation, according to Reinaldo *et al*. (2012), has been observed in similar species such as *Schinus molle* L., attributing the response to the reduction in the reproduction rates of meristematic cells. The sum, and in some cases the greater effectiveness of the fruit extracts, coincides with the suggestion about a greater proportion of allelochemicals in the reproductive structures in relation to its leaves (Carvalho *et al*., 2013). Said components, mainly of the phenolic type, generate instability in the permeability of the cell membrane, translating its effect into an alteration of the water level within the plant, potentiating its effect based on the increase of solutes in the solution (Buturi *et al*., 2015; Oviedo, 2020).

Initial growth

The *E. globulus* extract significantly reduces ($p < 0.05$) the growth of both weeds. The species *C. arvensis* was shown to be susceptible to the extracts from fruit and leaf structures, at 5 and 7.5 % concentrations, respectively (Figure 3). The total length of the seedling decreased between 28.3 - 44.3 % in relation to the control treatment (32.5 ± 1.9 mm). Meanwhile, *P. oleracea* responded in an homologous way to these treatments, however, the effective base concentration was established at 2.5 and 15 % for the leaf and fruit structure extracts, correspondingly. With a TL ≤ 7.6 ± 0.6 mm, seedling growth was reduced between 60 - 100 % in relation to the control treatment (19.0 ± 0.9 mm). The *E. globulus* leaf extract decreased the growth of the *P. oleracea* hypocotyl between 66.7 - 100.0 % from a concentration of 7.5 % (Figure 4). On the radicle, the leaf-based treatments stand out, starting from concentrations of 2.5 %, observing differences between 81.4 and 99.6 % with the HL spectrum of the control treatment (13.5 ± 1.3 mm).

For both weeds, although there is initial growth in the seedling, the decrease in TL depending on the concentration and recording time, implies a lag in the translocation of the allelochemicals in the embryo, allowing initial growth but reducing the cell reproduction rate as these are accentuated. Specifically to *C. arvensis*, Kandhro *et al*. (2016) highlights a similar behavior of *C. arvensis* when treated with the aqueous extract of the leaf structure from the species *E. camaldulensis*, whose effect could be related to the interference of mono-

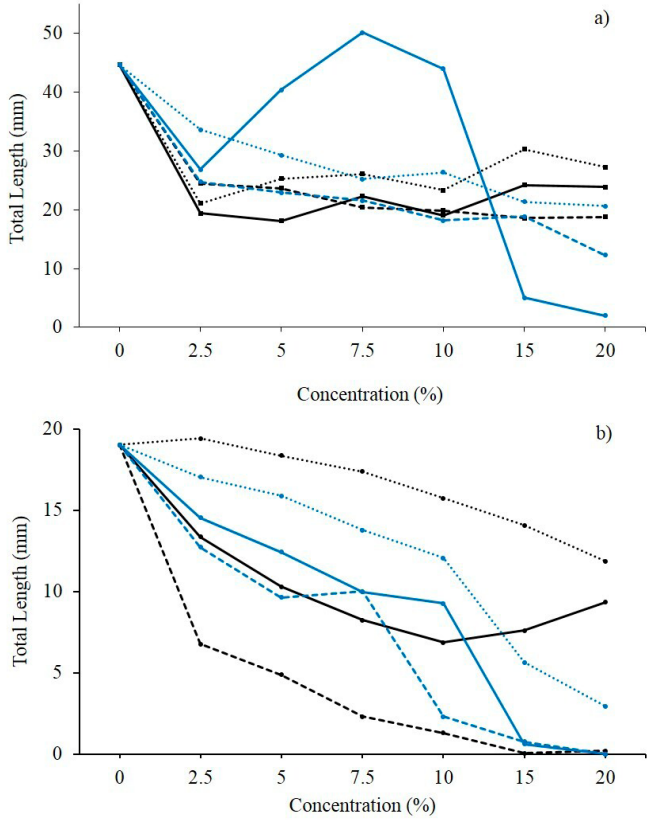


Figura 3. Promedios de la longitud total (LT) de plántulas de a) *Convolvulus arvensis* L. y b) *Portulaca oleracea* L. germinadas tras ser tratadas con extractos acuosos a distintas concentraciones de fruto (—), hoja (---) y corteza (···) de *Eucalyptus globulus* Labill. (●) y *Schinus terebenthifolius* Raddi. (●).

Figure 3. Means of the total length (TL) of seedlings germinated from a) *Convolvulus arvensis* L. and b) *Portulaca oleracea* L., after being treated with aqueous extracts at different concentrations of the fruit (—), leave (---) and bark (···) structures of *Eucalyptus globulus* Labill. (●) and *Schinus terebenthifolius* Raddi. (●).

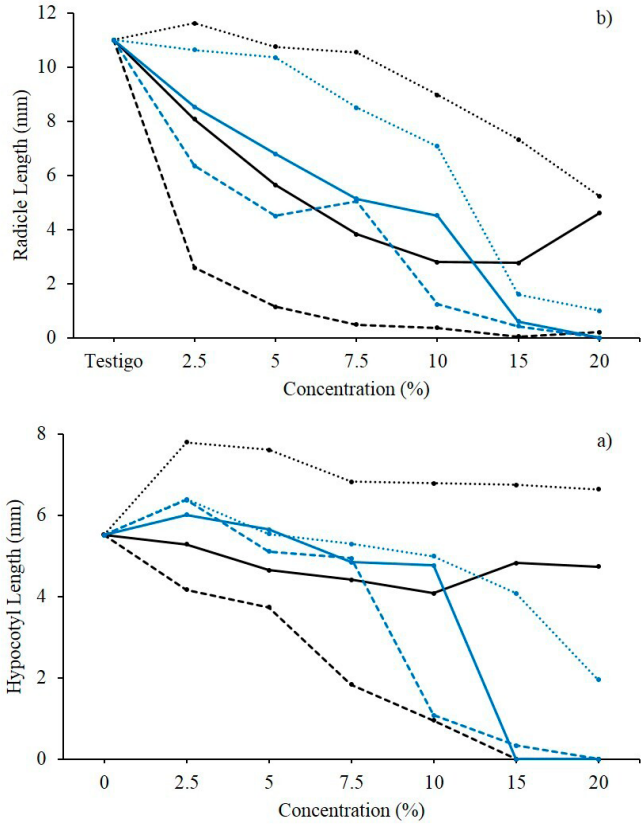


Figura 4. Promedios de la longitud de a) hipocótilo (LH) y b) longitud de radícula (LR) de plántulas de P. oleracea L. germinadas tras ser tratadas con extractos acuosos a distintas concentraciones de fruto (—), hoja (---) y corteza (···) de E. globulus Labill. (●) y S. terebenthifolius Raddi. (●).

Figure 4. Means of a) hypocotyl length (HL) and b) radicle length (RL), of seedlings germinated from P. oleracea L. after being treated with aqueous extracts at different concentrations of fruit (—), leaf (---) and bark (···) structures of Eucalyptus globulus Labill. (●) and Schinus terebenthifolius Raddi. (●).

terpenes in mitotic activity, and its translations into abnormal growth of the radicle and hypocotyl (Singh *et al*., 2005; Khan *et al*., 2008). Meanwhile, Pinto *et al*. (2021) infers that the growth restriction in *P. oleracea* seedlings could be due to a homeostatic imbalance, resulting from the metabolic decompensations of the oxido-reducer system.

Regarding *S. terebinthifolius*, 47.3 % of the treatments registered a significant effect ($p < 0.05$) on the initial growth of *C. arvensis*. The TL was reduced between 50.8 and 97.5 % when using the extracts of fruit and bark structures at 15 and 20 %, as well as those of the leaf structure from 7.5 to 20 % (Figure 3). Similarly, the TL of *P. oleracea* decreased significantly ($p < 0.05$) when using the leaf and fruit structure treatments at 15 - 20 % (TL ≤ 0.7 ± 0.1 mm), expressing differences in length between 97.5 and 100 % with respect to the LT of the control treatment (16.5 ± 0.8 mm). These observations were complemented by the null hypocotyl growth (0.0 ± 0.0 mm) registered when using the fruit (15 - 20 %) and leaf (20 %) structure treatments, followed by a decrease between 68.8 and 94.4 % with the leaf structure extracts at 10 - 15 %, and bark structure extracts at 20 % (Figure 4). In addition to this, the RL was reduced to 0.0 ± 0.0 mm when it was treated with the 20 % fruit and leaf structure extracts. The formulated fruit (7.5 to 15 %), leaf (5 to 15 %) and bark (15 - 20 %) structure extracts are added, all with a RL between 0.4 ± 0.0 - 5.1 ± 0.4 mm, and whose value represents a decrease at 53.3 %.

The evaluation of total or partite growth is recognized as a process of greater sensitivity to allelochemical components (Castro *et al*., 2004; Bundchen *et al*., 2015). The susceptibility of smaller radicles to the accumulation of allelochemicals is translated into the absence of absorbent hairs and an abnormal growth of the structure, coinciding with what was observed in the present study (Fonseca *et al*., 2016; Bitencourt *et al*., 2021).

CONCLUSION

The extracts evaluated inhibited the germination and initial *in vitro* growth of *C. arvensis* and *P. oleracea*. According to the evaluated weed, *P. oleracea* is the species with the highest susceptibility. According to the source, *E. globulus* expresses better results with the leaf formulations, while *S. terebenthifolius* does so with its fruits. In all the formulations, a relationship is observed between the concentration and the level of effectiveness obtained.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Amani, S., Rajabi, M. and Chaeechi, M. 2015. Inhibitory effects of lavender, absinthium and walnut on germination and seedling growth of *Convolvulus arvensis*, *Portulaca oleracea* and *Triticum aestivum*. Pakistan Journal of Weed Science Research. 21(4): 575-591. https://www.wssp.org.pk/weed/ojs/index.php/pjwsr/article/view/621

Avalos, G.A., Morales, R.L.M. and Rojas, M.X. 2019. Potencial antifúngico de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Revista Agricultura Tropical. 5(2): 39-45.

Ávila, Q.G.D., Torres, M.J.G., Sétamou, M., Gardea, B.A.A., Berzoza, G.C.A. and Orduño, C.N. 2022. Arvenses nativas y exóticas en parcelas de chile jalapeño. Revista Fitotecnia Mexicana. 45(3): 399-407. https://doi.org/10.35196/rfm.2022.3.399

Bañuelas, D.C., Questad, E.J. and Bobich, E.G. 2019. Interactions between the invasive *Schinus molle* (Peruvian pepper tree) with six plant species commonly found in Southern California nature reserves. Urban Forestry & Urban Greening, 43, 126348. https://doi.org/10.1016/j.ufug.2019.05.010

Barbosa, L.C.A, Filomeno, C.A. and Teixeira, R.R. 2016. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. Molecules. 21(12): 1671. https://doi.org/10.3390/molecules21121671

Bitencourt, G.A., Gonçalves, C.C.M., Rosa, A.G., Zanella, D.P. and Matias, R. 2021. Fitoquímica de Aroeira – Vermelha (S*chinus terebinthifolius* Raddi) na germinação de sementes. Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde. 25: 02-08. https://ensaioseciencia.pgsscogna.com.br/ensaioeciencia/article/view/8004

Blanco, B.Y., Leyva, G.A. and Castro, L.I. 2018. Determinación del período crítico de competencia de arvenses en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Cultivos tropicales. 39(3): 18-24. https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1461/pdf

Bündchen, M., Rousseau, J., Couto, S.S.L., Horn, A.C.M., Säge, M., Carpes, W.W., Lopes, T., Corassini, V.B. and Canto, S.C.R. 2015. Extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* Raddi inibem a germinação e o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. Scientia Tec. 2: 102-109. https://doi.org/10.35819/scientiatec.v2i1.1405

Buturi, C.V., Camargo de Mendonça, L., Cassol, F., Marcon, T. and Fortes, A.M.T. 2015. Potencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi na recuperação de áreas degradadas: interações aleloquímicas. Cultivando o Saber. 8: 49-58. https://cultivandosaber.fag.edu.br/index.php/cultivando/article/view/627/550

Carrascosa, A., Pascual, J.A., Ros, M., Petropoulos, S.A. and Alguacil, M.d.M. 2023. Agronomical practices and management for commercual cultivation of *Portulaca oleracea* as a crop: a review. Plants. 12: 1246. https://doi.org/10.3390/plants12061246

Carvalho, M.G., Melo, A.G.N., Aragão, C.F.S., Raffin, F.N. and Moura, T.F.A.L. 2013. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 15: 158-169. https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100022

Castro, R.D, Bradford, K.J. and Hilhorst, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de agua. En: Ferreira, A.G. y Borghetti, F. (org.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, pp 50-67.

Cortés, G.I., Pascual, R.E., Medina, T.S.M., Sandoval, F.E.A., Lara, P.E., Piña, R.H.H., Martínez, R.R. and Rojo, M.G.E. 2013. Etnozoología del pueblo Mayo-Yoreme em el Norte de Sinaloa: Uso de vertebrados silvestres. Agricultura, Sociedad y Desarrollo. 10: 335-358.

El-Ghit, H.M.A. and Hanan, M. 2016. Potent physiological allelopathic effect of eucalyptus leaf extract on *Malva*

parviflora L. (mallow) weed. Journal of Pharmaceutical, Chemical and. Biological Sciences. 3:584-591.

Espinoza, G.F.J. and Villaseñor, J.L. 2017. Biodiversity, distribution, ecology and management of non-native weeds in México: a review. Revista Mexicana de Biodiversidad. 88: 76-96. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.010

Fernandes, S.Y., Araújo, D., Pontes, M.S., Santos, J.S., Cardoso, C.A.L., Simionatto, E., Martines, M.A.U., Antunes, D.R., Grillo, R., Arruda, G.J. and Santiago, E.F. 2023. Pre-emergent bioherbicide potential of *Schinus terebinthifolia* Raddi essential oil nanoemulsion for *Urochloa brizantha*. 47:102598. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102598

Fonseca, V.B., Tavares, V.R. Gonçalves, V.M., Freitag, R.A. and Bobrowski, V.L. 2016. Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. Científica. 44: 35-39. https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n1p35-39

Galán, P.J.A. 2023. Dinámica de compuestos alelopáticos en suelos agrícolas en relación con su aprovechamiento como plaguicidas naturales. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla. 250 p. https://hdl.handle.net/11441/143243

González, P.C. 2017. *Eucalyptus globulus* Labill. for weed control in Organic Agriculture: from molecules to the field. Tesis de doctorado. Universidad de Vigo.

Kandhro, M.N., Jogi, Q., Buriro, M., Soomro, A.S., Laghari, G.M. and Khaskheli, A.N. 2016. Germination and seedling growth of *Convolvulus arvensis* L. and *Cyperus rotundus* L. under the allelopathic influence on *Eucalyptus camaldulensis* (L.) leaves. Sarhad Journal of Agriculture. 32(3): 252-257. http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2016.32.3.252.257

Khan, M.A., Hussain, I. and Khan, E.A. 2008. Suppressing effects of *Eucalyptus camaldulensis* L. on germination and seedling growth of six weeds. Pakistan Journal of Weed Science Research. 14(3-4): 201-207.

Maldaner, J., Steffen, G.P.K., Missio, E.L., Saldanha, C.W., De Morais, R.M., and Steffen, R.B. 2020. Rue and Brazilian peppertree essential oils inhibit the germination and initial development of the invasive plant lovegrass. International Journal of Environmental Studies. 77(2): 255-263. https://doi.org/10.1080/00207233.2020.1723963

Morsi, M.M. and Abdelmigid, H.M. 2016. Allelopathic activity of *Eucalyptus globulus* leaf aqueous extract on *Hordeum vulgare* growth and cytogenetic behavior. Australian Journal of Crop Science. 10(11): 1551-1556. http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.11.PNE122

Nunes, G.L., Paulert, R., Bido, G.S. and Zoneti, P.C. 2019. Potencial de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi para redução de plantas daninhas. Journal of Agronomic Sciences. 8:136-144.

Oviedo, M.M. 2020. Progresos en la investigación del uso de alelopáticos en la agricultura. Tesis de Grado. Universidad de Jaén, España.

Pinto, M., Soares, C., Martins, M., Sousa, B., Valente, B., Valente, I., Pereira, R. and Fidalgo, F. 2021. Herbicidal effects and cellular targets of aqueous extracts from young *Eucalyptus globulus* Labill. leaves. Plants. 10: 1159. https://doi.org/10.3390/plants10061159

Puig, C.G., Reigosa, M.J., Valentão, P., Andrade, P.B., and Pedrol, N. 2018. Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. PLoS ONE. 13:e0192872. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192872

Reinaldo, T. 2012. Fitotoxidez do extrato aquoso de *Schinus molle* L. e de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Tesis de grado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Brasil.

Rodríguez, N.S., Barranco, F.J.E., López, R.F.J., Nava, R.V., Flores, M.A. and Sánchez, P.L.C. 2015. Potencial alelopático de *Convolvulus arvensis* em semillas de alfalffa, trigo y garbanzo mendiante bioensayos. Sociedades rurales, producción y medio ambiente. 15(29): 45-58.

Sáez, H.F.J. 2019. Adsorción y persistencia de lixiviados alelopáticos acuosos de hojas de *Eucalyptus globulus* L. en un suelo trumao. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile.

Sánchez, G.A. and González, L.M. 2007. Técnicas de recolecta y herborización de plantas. En: Contretas, R.A., Goyenechea, I., Cuevas, C.C. e Iturbe, U. (eds.). La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Ciencia al Día 5. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pp. 177-193. ISBN 970-769-099-2.

SAS® OnDemand for Academics. 2022. SAS Institute Inc.

Shahzad, M.A., Ikram, R.M., Aslam, M., Roman, M., Iqbal, J., and Shah, A.R. 2023. Effect of leaf aqueous extracts of acacia, brassica, eucalyptus and sorghum on germination and growth of *Avena fatua* L. and *Phalaris minor* Retz. Pure and Applied Biology. 12: 365-377. http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2023.120039

Singh, H.P., Batish, D.R., Setia, N. and Kohli, R.K. 2005. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. Annals of Applied Biology. 146: 89-94. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.04018.x

Tamayo, E.L.M., Parra, C.F.I., Marroquin, M.J.A., Armenta, C.C.M. and León, M.J.R. 2023. Evaluación de herbicidas orgánicos para el control de correhuela *Convolvulus arvensis* L. em el sur de Sonora, México. En Memoria del XLII Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. 130-135 pp.

Xuan, T.D., Tsuzuki, E., Tawata, S. and Khan, T.D. 2004. Methods to determine allelopathic potential of crop plants for weed control. Allelopathy Journal. 13(2): 149-164.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Weight gain prevention during the December holiday season in adults: Pilot Randomized Controlled Trial

Prevención del aumento de peso durante las fiestas decembrinas en adultos: Ensayo Controlado Aleatorio Piloto

Diego Emmanuel Guerrero-Magaña[1,2], Michelle M. Haby[2], Teresita de Jesús Martínez-Contreras[2], Maria del Carmen Candia-Plata[3], Ana Lourdes Mata-Pineda[3], Julián Esparza-Romero[4], Mauro E. Valencia[5], Rosa C. Villegas-Valle[2] and Rolando Giovanni Díaz-Zavala[2]*

[1] Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud, Posgrado en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S / N, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.
[2] Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S / N, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.
[3] Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud, Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S / N, Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.
[4] Unidad de Investigación en Obesidad y 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.
[5] Profesor Emérito, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46. Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora.

ABSTRACT

The December holiday season is a critical period for weight gain in adults, accounting for 50 % of annual weight gain. Actually, there are few preventive interventions during this period. This work evaluated the effect of two online interventions for the prevention of weight gain in Mexican adults during the December holiday season in the COVID-19 pandemic. A three-arm pilot randomized controlled trial was implemented. The primary outcome was change in body weight at 8 weeks (at the end of the holiday season). At the end of the study, 78.1 % of the participants were retained. No differences between groups were found in body weight change (Watch your Weight During the Holidays (WWDH): -0.10 ± 1.81 (SD), 95 % CI [-1.40, 1.19]; Relative Fasting 5:2 (RF5:2): 0.92 ± 1.18, 95 % CI [0.12, 1.71] and control group: 0.15 ± 1.68, 95 % CI [-0.98, 1.28]). The results show that the trial was feasible, that a behavioral intervention using self-weighing and nutrition counseling (WWDH group) had potentially beneficial results, while the RF5:2 intervention was not promising during this period. In addition, this pilot allowed the design of a definitive study.

Keywords: Primary Prevention, Holidays, Weight Gain, Adults, Overweight.

RESUMEN

Las fiestas decembrinas son un periodo crítico para la ganancia de peso en adultos, donde se gana más del 50 % del incremento de peso anual. Actualmente, existen pocas intervenciones preventivas durante este periodo. Este trabajo evaluó el efecto de dos intervenciones en línea para la prevención del aumento de peso en adultos mexicanos durante las fiestas decembrinas en la pandemia por COVID-19. Se implementó un ensayo controlado aleatorio piloto de tres brazos. La variable principal fue el cambio en el peso corporal a las 8 semanas (al finalizar las fiestas decembrinas). Al final del estudio, se retuvo al 78.1 % de los participantes. No se encontraron diferencias en el cambio del peso corporal entre los grupos (Cuida tu Peso Durante las Fiestas Decembrinas (CPDFD): -0.10 ± 1.81 (DE), IC95 % de [-1.40 a 1.19]; Ayuno Relativo 5:2 (AR5:2): 0.92 ± 1.18, IC95 % [0.12 a 1.71] y grupo control: 0.15 ± 1.68, IC95 % [-0.98 a 1.28]). Los resultados muestran que el ensayo fue factible, que la intervención con auto pesaje y consejería nutricional (grupo CPDFD) aplicada tuvo resultados potencialmente beneficiosos, mientras que la intervención RF5:2 no fue prometedora durante este período. Asimismo, el trabajo permitió el diseño de un estudio definitivo.

Palabras clave: Prevención Primaria, Vacaciones y Feriados, Aumento de Peso, Adultos, Sobrepeso.

INTRODUCTION

The December holiday season is the festive period with the greatest impact on adult body weight (Zorbas *et al*., 2020; Díaz-Zavala *et al*., 2017). Observational studies have shown that more than 50 % of the annual weight is gained during this period (Yanovski *et al*., 2000; Sturm *et al*., 2016). Globally, few preventive interventions have been conducted during the December holidays and have been implemented in US and UK (Kaviani *et al*., 2019; Hirsh *et al*., 2019; Mason *et al*., 2018; Watras *et al*., 2006; Zorbas *et al*., 2020). Therefore, interventions are needed to prevent weight gain in this critical period, and outside these populations. This work sought to evaluate the effect of two online interventions on the prevention of body weight gain, compared to a control group in Mexican adults during the holiday season, in order to test the feasibility of the methodology and obtain data to calculate the sample size of a definitive study. The study coincided with the COVID-19 pandemic, which appears to have nega-

*Author for correspondence: Rolando Giovanni Díaz-Zavala
e-mail: giovanni.diaz@unison.mx
Received: August 25, 2023
Accepted: April 23, 2024
Published: June 07, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2134

tively affected diet, physical activity, and body weight of the population (Bennett *et al*., 2021).

MATERIALS AND METHODS

This exploratory pilot randomized controlled trial of parallel groups, with three arms, was approved by the Research Ethics Committee of the Department of Nursing at the University of Sonora (registration number: CEI-ENFERMERÍA-EPD-002-2020). This report follows the recommendations of the Consolidated Standards of Reporting Trials guide, in its extension for pilot studies (Eldridge *et al*., 2016) and was registered in ClinicalTrials.gov platform (NCT05060978) prior to conduct of the trial.

Participants

Participants were adults with normal weight, overweight or obesity, recruited online (through flyers, posters, direct invitation, and social networks) at the city of Hermosillo, Sonora, México. Eligibility criteria were evaluated and their consent was obtained. Participants were eligible for inclusion if they were adults with a BMI classified as normal weight, overweight or obesity (BMI ≥ 23 kg/m^2 and ≤ 40 kg/m^2), aged between 20 and 65 years, and residents of the city of Hermosillo, Sonora. They also had to commit to not undertake any other intervention outside the one assigned in the study during the 8 weeks of the intervention. We excluded people with a previous diagnosis of a medical condition that constituted a contraindication for the intervention or that could affect body weight.

Randomization

Participants were randomized by blocks, stratified by sex and age, with a 1:1:1 allocation ratio, to the three different intervention groups: 1) Watch your Weight During the Holidays Program (WWDH), 2) Relative fasting 5:2 (RF5:2), or 3) control group. Assignment to groups was performed by a member of the research group not involved in the recruitment of participants, nor intervention implementation.

Interventions

The WWDH group comprised self-efficacy and habit formation through encouragement of participants to record their weight at least one time during each week (self-weighing), follow 10 tips for weight management during the holidays, graphical information about physical activity calorie equivalents (PACE) of Mexican foods and drinks, and three video calls for nutrition counseling (one group and two individual video calls). The RF5:2 group received a dietary recommendation to follow a 5:2 intermittent fasting approach, along with two video calls for nutrition counseling related to intermittent fasting (one group and one individual video call). They were given low-energy menus of 550 kcal/day and 660 kcal/day for women and men, respectively, to follow during two fasting days. During the remaining five days, there was no energy restriction. The control group received an explanation of a healthy eating leaflet, based on a Mexican Standard for health promotion: NOM-043-SSA-2012. To encourage retention, study participants obtained a weighing scale as a reward for completing the ten-week measurements. Detailed information about each intervention group can be seen in Supplement 1.

Outcomes

The primary outcome was change in body weight at 8-weeks. Measurements were originally planned to be at eight-weeks but high reports of COVID-19 infections by study participants during the holiday season resulted in a delay of two weeks (10-weeks). Secondary outcomes of body size and composition, biochemical variables and health-related quality of life were also measured at 10-weeks. Baseline measurements were assessed from November 1 to 12, 2021, and final measurements from January 24 to February 2, 2022. The outcome assessors were blinded to treatment allocation status (TJMC and ALMP). Techniques and details about how measures were taken for each outcome can be consulted in Supplement 1.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with one-way ANOVA tests for parametric samples or Kruskal-Wallis tests for nonparametric samples, using statistical software NCSS 10 (Number Cruncher Statistical System for Windows, Kaysville, UT, USA). All analyses were performed using the intention-to-treat approach and, secondarily, with those who completed all measurements.

RESULTS

Thirty-two participants were recruited and randomized to the three different intervention groups: WWDH Program (n = 10), RF5:2 (n = 11) and control group (n = 11). Figure 1 shows the flow diagram of study participants. At the end of the study measurements, a retention of 78.1 % of the participants was achieved.

Participants were predominantly female (65.6 %), with a mean age ± standard deviation of 38.1 ± 11.3 years, and BMI of 30.4 ± 3.84 kg/m^2. There were no significant differences between groups at baseline in any of the characteristics as was expected due to the randomization process (Table 1). Table 2 shows the results of the variables analyzed by the ITT approach. Results for weight change at 10 weeks showed no difference between groups (WWDH: -0.10 ± 1.81, 95 % CI -1.40 to 1.19; RF5:2: 0.92 ± 1.18, 95 % CI 0.12 to 1.71 and control group: 0.15 ± 1.68, 95 % CI from -0.98 to 1.28) (Figure 2), though a positive trend was observed for the WWDH group and a negative trend for the RF5:2 group, both compared to the control group. For secondary outcomes, no differences were observed between the groups.

Analysis by those who completed all study measurements also showed no difference between groups in body weight change at 10 weeks or in any of the secondary outcomes evaluated (Figure 3). During the 10-week study period, no adverse effects were reported by study participants.

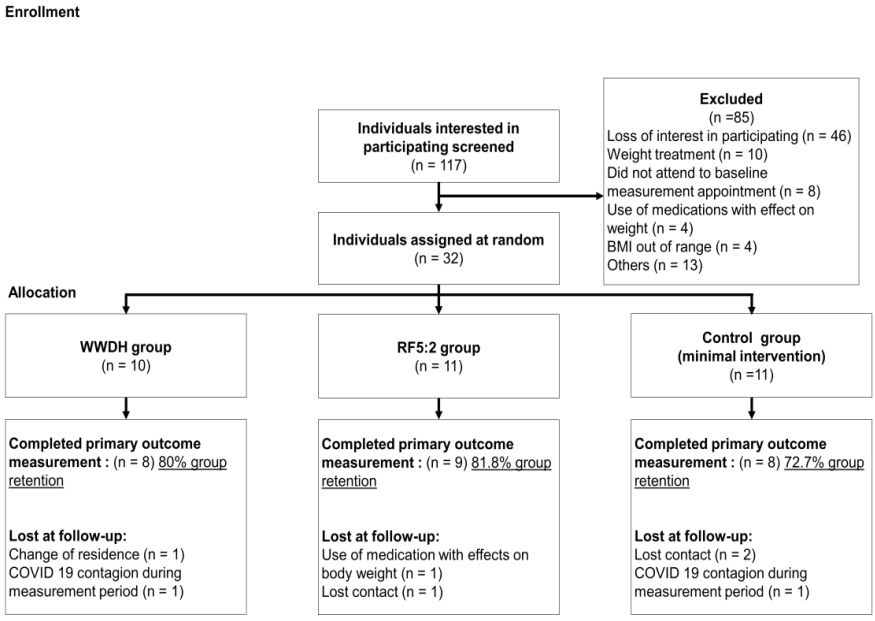


Figure 1. Flow diagram of study participants. Abbreviations: WWDH: Watch your Weight During the Holidays, RF5:2: Relative Fasting 5:2.
Figura 1. Diagrama de flujo de los participantes del estudio. Abreviaturas: CPDFD: grupo Cuida tu Peso Durante las Fiestas Decembrinas, AR5:2: grupo Ayuno Relativo 5:2, Control: grupo Control.

Table 1. Baseline characteristics of participants.
Tabla 1. Características basales de los participantes.

Outcome	WWDH group (n= 10)	RF5:2 group (n= 11)	Control group (n= 11)	P Value
Sex n (Femenine %)	7 (70.0)	7 (63.6)	7 (63.6)	0.94
Age (years)	37.5 (11.5)	39.7 (12.5)	38.1 (11.3)	0.84
Weight (kg)[a]	77.1 (68.8, 97.4)	77.1 (69.4, 109)	87.0 (79.1, 99.5)	0.58
BMI (kg/m2)	29.5 (3.60)	30.8 (4.98)	30.7 (2.87)	0.69
Waist circumference (cm)	97.5 (11.8)	100 (15.8)	101 (9.37)	0.71
Fat mass (kg)	31.3 (7.68)	35.0 (9.49)	35.1 (7.02)	0.49
Fat free mass (kg)[a]	43.3 (40.8, 67.5)	42.1 (39.9, 54.1)	49.2 (44.5, 64.7)	0.68
Systolic blood pressure (mm/Hg)	124 (12.3)	118 (11.9)	120 (14.5)	0.62
Diastolic blood pressure (mm/Hg)	82.1 (10.1)	78.2 (9.74)	79.1 (11.1)	0.68
Biochemical outcomes				
Fasting glucose (mg/dL)	89.6 (10.1)	81.3 (10.2)	84.4 (12.1)	0.21
Total cholesterol (mg/dL)	186 (40.7)	213 (50.6)	186 (44.8)	0.30
LDL cholesterol (mg/dL)	117 (32.0)	134 (36.9)	114 (38.8)	0.39
HDL cholesterol (mg/dL)	42.9 (6.69)	47.6 (9.61)	43.0 (7.18)	0.32
Triglycerides (mg/dL)	129 (64.5)	157 (134)	145 (66.6)	0.84
Health-related quality of life outcomes				
Physical function[a]	95.0 (85.0, 100)	95.0 (83.7, 100)	89.1 (85.0, 100)	0.92
Physical problems[a]	100 (68.7, 100)	100 (93.7, 100)	100 (50.0, 100)	0.47
Pain	80.2 (15.5)	89.5 (10.3)	80.2 (16.8)	0.27
Social function	83.7 (15.6)	85.0 (17.4)	79.5 (18.7)	0.75
Mental health	72.0 (14.3)	77.6 (17.6)	70.1 (13.8)	0.52
Emotional problems	56.6 (38.6)	70.0 (39.9)	60.6 (29.1)	0.69
Vitality	62.5 (16.8)	62.0 (23.7)	64.0 (16.4)	0.96
Perception of general health	69.5 (15.7)	77.5 (14.9)	65.4 (20.3)	0.28
Health changes over time	65.0 (24.1)	62.5 (21.2)	61.3 (30.3)	0.94

Baseline characteristics of participants, expressed as mean (percentage) or mean (standard deviation), one-way ANOVA test; and [a]median (percentiles 25 and 75), Kruskal-Wallis test.
Abbreviations: WWDH: Watch your Weight During the Holidays, RF5:2: Relative Fasting 5:2.

Table 2. Changes in outcomes from baseline to 10-weeks of follow-up.
Tabla 2. Cambios en las variables desde el inicio hasta las 10 semanas de seguimiento.

Outcome	WWDH group (N= 10)	RF5:2 group (N= 11)	Control group (N= 11)	P value
Weight (kg)	-0.10 (-1.40, 1.19)	0.92 (0.12, 1.71)	0.15 (-0.98, 1.28)	0.30
BMI (kg/m2)	-0.04 (-0.51, 0.42)	0.34 (0.05, 0.63)	0.06 (-0.32, 0.45)	0.27
Waist circumference (cm)	-0.36 (-1.71, 0.99)	0.14 (-0.92, 1.21)	-0.97 (-2.43, 0.49)	0.39
Fat mass (kg)[a]	0.12 (-0.31, 1.80)	0.56 (-0.02, 1.67)	0.12 (0.00, 0.45)	0.57
Fat free mass (kg)[a]	-0.63 (-1.71, 0.14)	0.05 (-0.33, 0.66)	0.16 (0.00, 0.81)	0.57
Systolic blood pressure (mm/Hg)	1.00 (-6.53, 8.53)	2.00 (-2.29, 6.29)	4.54 (1.41, 7.67)	0.57
Diastolic blood pressure (mm/Hg)	-3.40 (-8.87, 2.07)	-0.45 (-5.59, 4.68)	-1.18 (-5.75, 3.39)	0.57
Biochemical outcomes				
Fasting glucose (mg/dL)[a]	0.00 (-4.00, 2.00)	0.00 (0.00, 12.0)	0.00 (0.00, 10.0)	0.16
Total Cholesterol (mg/dL)[a]	28.6 (5.41, 51.7)	16.2 (-21.6, 54.1)	8.45 (-12.4, 29.3)	0.13
LDL cholesterol (mg/dL)[a]	20.5 (0.00, 35.7)	0.00 (-1.00, 14.0)	0.00 (-4.00, 27.0)	0.11
HDL cholesterol (mg/dL)[a]	0.00 (0.00, 8.75)	0.00 (0.00, 13.0)	0.00 (0.00, 4.00)	0.92
Triglycerides (mg/dL)[a]	0.00 (-29.0, 33.5)	0.00 (-8.00, 8.00)	0.00 (-45.0, 12.0)	0.77
Health-related quality of life outcomes				
Physical function[a]	0.00 (-1.25, 6.25)	0.00 (0.00, 5.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.49
Physical problems[a]	0.00 (-6.25, 6.25)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.93
Pain	5.44 (-10.0, 14.5)	-5.90 (-20.7, 8.94)	5.00 (-1.14, 11.1)	0.31
Social function[a]	0.00 (-18.7, 15.6)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 12.5)	0.56
Mental health	-2.40 (-11.3, 6.56)	-2.18 (-8.46, 4.10)	4.36 (-0.93, 9.66)	0.22
Emotional problems	-30.0 (-53.7, -6.28)	6.05 (-21.9, 34.0)	6.07 (-10.7, 22.8)	0.03[b]
Vitality	-1.00 (-10.6, 8.65)	10.0 (-0.62, 20.6)	-1.36 (-6.58, 3.85)	0.07
Perception of general health[a]	-2.50 (-10.0, 6.25)	0.00 (-5.00, 10.0)	0.00 (-5.00, 0.00)	0.65
Health changes over time	-7.50 (-26.4, 11.4)	4.54 (-15.1, 24.1)	-9.09 (-20.4, 2.23)	0.38

Changes in outcomes from baseline to 10-weeks of follow-up, expressed as mean (percentage) or mean (standard deviation), one-way ANOVA test; and [a]median (percentiles 25 and 75), Kruskal-Wallis test.
[b] Statistically significant differences with one-way ANOVA test, without differences with Bonferroni test.
Abbreviations: WWDH: Watch your Weight During the Holidays, RF5:2: Relative Fasting 5:2.

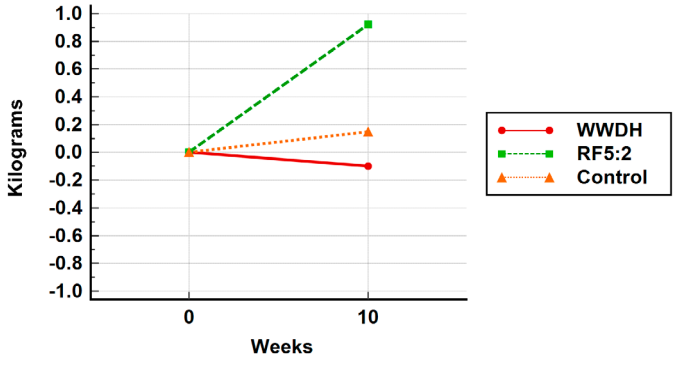


Figure 2. Body weight changes during the holiday season from baseline to 10-weeks, Intention-to-Treat approach analysis. Abbreviations: WWDH: Watch your Weight During the Holidays group, RF5:2: Relative Fasting 5:2 group, Control: Control group.
Figura 2. Cambios en el peso corporal durante las fiestas decembrinas desde el inicio hasta las 10 semanas, análisis con abordaje de Intención de Tratar. Abreviaturas: CPDFD: grupo Cuida tu Peso Durante las Fiestas Decembrinas, AR5:2: grupo Ayuno Re-lativo 5:2, Control: grupo Control.

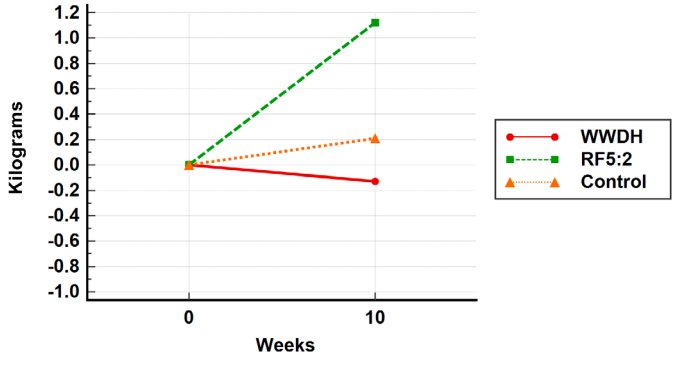


Figure 3. Changes in body weight during the holiday season at 10-weeks in participants who completed the study measurements. Abbreviations: WWDH: Watch your Weight During the Holidays group, RF5:2: Relative Fasting 5:2 group, Control: Control group.
Figura 3. Cambios en el peso corporal durante las fiestas decembrinas a las 10 semanas de seguimiento de los participantes que terminaron las mediciones del estudio. Abreviaturas: CPDFD: grupo Cuida tu Peso Durante las Fiestas Decembrinas, AR5:2: grupo Ayuno Relativo 5:2, Control: grupo Control.

DISCUSSION

This pilot study showed non-significant positive effects on weight gain prevention in favor of the WWDH group, compared to the RF5:2 and the control groups. The positive result of the WWDH group was a bit less than expected, compared to other studies on the prevention of weight gain during the holiday season. A systematic scoping review showed that intervention studies during this holiday period have achieved significant weight loss, mostly in favor of the intervention group (Zorbas *et al*., 2020). The review showed weight losses from 0.13 kg to 1.30 kg in the intervention groups and weight gains from 0.09 to 1.10 kg in the control groups (Zorbas *et al*., 2020). The effect of the RF5:2 group was opposite to what we expected and showed a similar behavior to the control groups of previous studies. We are not sure if this is due to this type of intervention not being culturally acceptable in Mexican participants, as it has not been tested previously outside of high-income countries (Harris *et al*., 2018; Cioffi *et al*., 2018), or whether it was due to the difficulty of maintaining normal eating habits on the five non-fasting days during the holiday season.

The data from this study will allow the implementation of this methodology in a definitive randomized controlled trial with a larger sample size. Given the results obtained by the RF5:2 intervention during this period, we have removed this intervention from the definitive study (NCT05580926). We also intend to use face-to-face rather than online sessions for the WWDH intervention, and remove the last individual session in the intervention group. Finally, considering the data from this pilot study (mean differences and SDs from WWDH and RF5:2, assuming that the RF5:2 group acted as a control group) and taking into account other published studies (Mason *et al*., 2018; Kaviani *et al*., 2019), it was possible to calculate a sample size of 64 participants for a definitive study (32 in each arm).

Among the strengths of our pilot study is that, to our knowledge, is the first randomized controlled trial seeking to prevent December holiday body weight gain remotely and during the COVID-19 pandemic. It is also the first in this period in a population outside of the United States of America and the United Kingdom. Among the limitations of our study was the presence of the uncertain pandemic outlook, which we believe strongly affected the retention of study participants which may have negatively affected the ability of the participants to adhere to the interventions, particularly the RF5:2 intervention. Likewise, the small sample size typical of a pilot or exploratory study could be taken as a limitation, but it fulfilled its purpose in proving that the intervention was feasible (while suggesting areas for improvement) and allowed the calculation of a sample size for a definitive study.

In conclusion, the results of this study showed that a trial aimed at preventing weight gain during the December holiday period is feasible in Mexican adults, having retained 78.1 % of the participants. It also showed that, while the WWDH intervention was promising, the RF5:2 intervention was not promising in Mexican adults during this period.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the program of Postgraduate in Health Sciences of the University of Sonora and CONAHCYT for the support provided to obtain this product.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no support from any organization for the work presented; no financial relationship with any person who may have an interest in the work submitted in the previous three years; and there are no other relationships or activities that have influenced the work submitted.

REFERENCES

Bennett, G., Young, E., Butler, I. and Coe, S. 2021. The impact of lockdown during the covid-19 outbreak on dietary habits in various population groups: A scoping review. Frontiers in Nutrition. 8.

Cioffi, I., Evangelista, A., Ponzo, V., Ciccone, G., Soldati, L., Santarpia, L., Contaldo, F., Pasanisi, F., Ghigo, E. and Bo, S. 2018. Intermittent versus continuous energy restriction on weight loss and cardiometabolic outcomes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Translational Medicine. 16, 371-371.

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. 13.

Eldridge, S. M., Chan, C. L., Campbell, M. J., Bond, C. M., Hopewell, S., Thabane, L. and Lancaster, G. A. 2016. Consort 2010 statement: Extension to randomised pilot and feasibility trials. The BMJ. 355, i5239.

Harris, L., Hamilton, S., Azevedo, L. B., Olajide, J., De Brun, C., Waller, G., Whittaker, V., Sharp, T., Lean, M., Hankey, C. and Ells, L. 2018. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: A systematic review and meta-analysis. JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports. 16, 507-547.

Hirsh, S. P., Pons, M., Joyal, S. V. and Swick, A. G. 2019. Avoiding holiday seasonal weight gain with nutrient-supported intermittent energy restriction: A pilot study. Journal of nutritional science, 8, e11-e11.

Kaviani, S., Vandellen, M. and Cooper, J. A. 2019. Daily self-weighing to prevent holiday-associated weight gain in adults. Obesity. 27, 908-916.

Mason, F., Farley, A., Pallan, M., Sitch, A., Easter, C. and Daley, A. J. 2018. Effectiveness of a brief behavioural intervention to prevent weight gain over the christmas holiday period: Randomised controlled trial. The BMJ. 363**,** k4867.

Sturm, R., Patel, D., Alexander, E. and Paramanund, J. 2016. Seasonal cycles in food purchases and changes in BMI among south africans participating in a health promotion programme. Public Health Nutrition. 19, 2838-2843.

Watras, A. C., Buchholz, A. C., Close, R. N., Zhang, Z. and Schoeller, D. A. 2006. The role of conjugated linoleic acid in reducing body fat and preventing holiday weight gain. International Journal of Obesity. 31, 481.

Yanovski, J. A., Yanovski, S. Z., Sovik, K. N., Nguyen, T. T., O'neil, P. M. and Sebring, N. G. 2000. A prospective study of holiday weight gain. The New England Journal of Medicine. 342, 861-867.

Zorbas, C., Reeve, E., Naughton, S., Batis, C., Whelan, J., Waqa, G. and Bell, C. 2020. The relationship between feasting periods and weight gain: A systematic scoping review. Current Obesity Reports. 9, 39-62.

SUPPLEMENT 1

Interventions

The three different intervention arms are described below according to the guide and checklist of the Template for Intervention Description and Replication (TIDieR) (Hoffmann *et al*., 2014).

Watch Your Weight During the Holidays Program: This intervention group included self-monitoring strategies (self-weighing, diet monitoring and physical activity), and nutrition counseling and education. The nutritional consultation and education mainly sought to prevent weight gain during the holidays, by reporting nutritional needs according to their body composition, in addition to the use of digital materials that contained information on low-energy menus, "10 tips to lead a healthy lifestyle and how to self-monitor your weight, diet and physical activity." In addition, participants in this group received a weighing scale to achieve self-monitoring of body weight from the beginning of the study intervention until the end of the 8-weeks follow-up. Participants who completed the 8-weeks measurements received this weighing scale as gift.

The basis of this strategy was the theory of self-regulation. This theory mentions that the change in behavior occurs when the person monitors the current state of their own actions and compares them with a reference goal or "gold standard" established goal (Boutelle, 2006; Orehek *et al*., 2017). The difference between the two behaviors involves the participant in a "feedback loop", which adjusts their behavior to achieve the goal (Boutelle, 2006). When the person perceives that there are differences between the current and desired state, they begin to take actions to reduce them. For this, self-regulation obeys two basic processes: 1) The evaluation process, which occurs when the person makes comparisons, and 2) the locomotion process (actions to move forward) (Orehek *et al*., 2017). Establishing clear objectives is essential in the approach of self-regulation. Once goals are identified, the ability to track behavior, or self-control, becomes essential, as attention to internal and external cues leads to greater control of behavior. Self-monitoring of food intake, physical activity and weight are ways in which the participant can evaluate their own current behavior and compare it with a standard (Boutelle, 2006).

Systematic reviews show that self-regulation can be an effective strategy in preventing body weight gain. Also, they mention that the best way to impact prevention using this technique is with the implementation of low intensity interventions that incorporate face-to-face and non-face-to-face strategies (self-monitoring of weight and nutritional information) (Lemmens *et al*., 2008; Hutfless *et al*., 2013; Lombard *et al*., 2009).

The intervention took place during the last two weeks of the month of November 2021 until the first two weeks of the month of January 2022. During the intervention period, participants were offered one individual and one group Zoom video call session with a maximum duration of 30 minutes for each session, which were led by two of the members of the study staff (DEGM and TJMC). DEGM and TJMC have a bachelor's degree in Nutritional Sciences as well as a Master of Health Sciences degree. Between November 17 and 19 the participants were contacted in an individual video call to inform them of their assigned group and to give initial instructions about how to perform their self-monitoring strategies (self-weighing, diet monitoring and physical activity monitoring) and receive information about their nutritional status, in relation to their body composition. Also, in this individual session another individual session with a nutritionist was scheduled for one of the first two weeks of the month of January. In the group video call session (November 26) they were trained and given supplementary material with strategies for self-monitoring (body weight, diet, and physical activity), information on healthy lifestyles, as well as information about the energy contained in festive meals and their equivalent in minutes of physical activity or steps per day (Mason *et al*., 2018). In the case that any participant missed the group videocall session, a link to a video recording of the group session was sent by message via WhatsApp or e-mail.

It was recommended that participants weigh themselves at least twice a week, as a form of self-monitoring of weight, from the beginning of the intervention. Participants had access to weekly formats with boxes where they could fill in the data obtained for each day of self-monitoring of weight, report their energy restriction and minutes of physical activity. In addition, participants were encouraged to restrict the energy they consumed for at least two days of the week, in order to compensate in case that they overconsumed calories ("posadas" or various social meetings, Christmas, New Years, etc.). For this, the participants were informed about the recommended energy consumption according to their needs and were given printed menus with low calorie diets (1200 - 1600 kcal / day) to follow for at least two days of the week.

In the January individual session with the nutritionist, the participants with overweight were not denied weight loss counseling, if they requested it. This counseling used the same intervention pattern as described above. Both the group and individual sessions were implemented in a video call, using Zoom as a video call platform.

During December 7, 21 and January 4 participants had short contact through messages through WhatsApp, telephone texts, calls or e-mail with DEGM to talk about their adherence to the intervention, possible adverse effects that they were experiencing, or any other topic related to this study.

Relative 5:2 Fasting: Participants in this group received eating recommendations to follow 5:2 intermittent fasting. This intermittent fasting approach has been shown to be a potential strategy to avoid weight gain (Harris *et al*., 2018).

Intermittent energy fasting has two popular variants: 5:2 intermittent fasting and alternate days of fasting. One of the most common strategies is 5:2 intermittent fasting, which involves 5 days of regular food consumption (with ad libitum consumption patterns) exchanged with 2 consecutive or non-consecutive fasting days per week –maximum energy consumption of 500 kcal for women and 600 kcal for men– with a period without energy intake of 12 to 21 hours per day (Harris *et al*., 2018; Cioffi *et al*., 2018). In the context of the country where the intervention will take place, a fast, for most people, means not consuming the first meal of the day (breakfast or meal eaten before noon). This intervention group was named Relative Fasting 5:2 (referring to 5:2 intermittent energy fasting), and the participants in this group were able to decide whether their fast was before or after noon.

In studies of the management of obesity, it has been observed that using 5:2 intermittent energy fasting gives a weight loss similar to that obtained with conventional caloric restriction (hypocaloric diets) (Cioffi *et al*., 2018). In a meta-analysis of studies where intermittent fasting is compared with a group without weight loss treatment, a difference in body weight loss of 4.14 kg ± 2.16 kg (P <0.001) is obtained (Harris *et al*., 2018).

The mechanism of action of intermittent fasting for weight loss is not only in the pronounced energy restriction on days with calorie restriction, but is also found in the production of ketone bodies in the liver from fatty acids as a result of spending more than 10 hours without energy intake (de Cabo y Mattson, 2019). These ketone bodies are not only used for energy production purposes for some tissues and organs, but also act as powerful signaling agents in cells and functions of different organs. It is believed that one of the functions of ketones is to regulate appetite. However, the mechanism of action remains uncertain (de Cabo y Mattson, 2019; Liu *et al*., 2020).

This intervention group included one individual session between November 17 and 19 and a group video call session on November 26, with a maximum duration of 30 minutes each. The sessions were led by the same two members of the study committee (DEGM and TJMC).

As in the aforementioned group, during the first individual video call session, participants scheduled an additional individual meeting with a nutritionist for between January 3 and 14.

In the group session the participants received information on how to perform the 5:2 relative fasting. They were given low-calorie menus of 550 kcal and 660 kcal, for women and men respectively, which were to be applied on fasting days, as has been done in similar studies (Cioffi *et al*., 2018). The composition of the macronutrients in the diet were in accordance with the recommendations of a healthy diet (Great Britain Panel on Dietary Reference, 1991). The fasting was held twice a week and on the remaining five days, the participants did not have any type of energy restriction (it was ad libitum). They only received the general recommendation to adhere to a healthy dietary pattern.

As in the previous intervention group, the individual video call session with the nutritionist followed the group approach (Relative Fasting 5:2). Participants with overweight were not denied weight loss counseling at these sessions if requested. In cases where guidance was requested, it followed the same themes as this intervention group. Both the group and individual sessions were implemented in a video call, using Zoom as the video call platform.

Like the previous group, participants in this group received three short contacts through WhatsApp messages, telephone texts, calls or e-mail with DEGM to talk about their adherence to the intervention, possible adverse effects that they were experiencing, or any other topic related to this study. These short contacts were scheduled for December 8, 22, and January 5.

Control group (minimal intervention): Participants in this group received online information and a PDF file brochure during an individual video call session at the beginning of the 8-week period (from DEGM). This information was about leading a healthy lifestyle. In addition, the brochure contained information on healthy eating based on the Mexican Standard for health promotion and education for healthy eating in Mexico (NOM-043-SSA2-2012) (Norma Oficial Mexicana, 2013). Apart from this, participants in this group did not receive any contact with interventionists in our study. The only additional contact they had with a member of the project committee (DEGM) was to schedule the measurements corresponding to 8 weeks.

Explanation for choosing the comparator

Due to our interest in evaluating the effect, feasibility, and acceptability of two interventions that had not been previously evaluated in terms of their intensity, components and population, the control group received a much less intensive intervention, but with positive components for the health of the participants. In several previous studies in the area, very low intensity interventions have been used as comparators (Mason *et al*., 2018; Kaviani *et al*., 2019; Hirsh *et al*., 2019).

General proceedings and recommendations

The three individual measurement sessions were in person at the Nutrition Health Promotion Center located on the ground floor of the 7J building of the School of Nutritional Sciences of the University of Sonora.

In all interventions, participants were recommended to perform at least 150 minutes of physical activity a week. During the 8-week period, participants in any of the intervention groups were told to avoid following interventions with an effect on body weight unrelated to those in their study group. In case of presenting conditions during the intervention period that required immediate action on body weight, they were not contraindicated but participants were requested to declare them to the project committee. However, during the same 8-week period, they were able to exercise or improve their diet on their own initiative if they so wished

(without support from healthcare providers, health professionals, nutritional coaches, personal trainers, etc.). Once the period of measurements at 8 weeks of the participants in each intervention group had concluded, the participants were able to perform any other change or activity with an effect on body weight that could benefit their health. These changes or activities other than the interventions delivered could be made accompanied or not by a health care professional.

Criteria for discontinuing the intervention

Those participants who presented a medical condition or received any treatment that had significant implications on body weight during the protocol, who received any intervention outside the protocol during the 8 weeks of the Holidays, or who decided to abandon the intervention or withdrew their informed consent were discontinued from the intervention.

Program cost

Participants did not pay for the program. Patient materials for intervention sessions or individualized nutrition sessions when applicable were provided free of charge. Participants were only responsible for buying the foods for their diet.

Measurements of the study variables

For all face-to-face measurements, COVID-19 recommendations for medical appointments were followed. For this scenario, WHO suggested collecting all possible data by telephone or other non-face-to-face means. If a visit was necessary, it was recommended to have disinfectant gel, medical or surgical masks for all study participants, respect the distance between people, take care of ventilation and avoid agglomerations (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Following the above recommendations, participants were measured for primary and secondary variables using a combination of face-to-face measurements and online forms during the first two weeks of November for baseline measurements. Afterwards, the variables were measured again, following the same recommendations, at the end of the 8 weeks intervention. These measurements were conducted during the last two weeks of January.

For each of the measurements, the participants were required to fast for 8 to 12 hours and to have at least 2 hours without water intake, for body composition and body size measurements, preferably with empty intestines and bladder. In addition, participants were instructed to not perform vigorous physical activity during the 24 hours prior to measurements.

Data collection methods

The study measurements took place during the initial phase, and at 8 weeks at the Nutrition Health Promotion Center (assessed by TJMC) and the Clinical Biochemistry Laboratory of the University of Sonora (obtained by ALMP), by outcome assessors from our research team (blinded to group assignment). Due to the pandemic of COVID-19, the measurements body weight, body size, blood pressure, and collection of the blood sample took place in the Nutrition Health Promotion Center and the Biochemistry Laboratory of the University of Sonora, following the above WHO recommendations for face-to-face medical appointments. The paper forms for health-related quality of life, scales of satisfaction, adherence to intervention and sociodemographic information were obtained in the outdoors space near the Nutrition Health Promotion Center.

Primary measurement

Body weight. It was measured with a digital SECA scale, model 284 (Seca Gmbh & Co. Hammer Steindamm 9-25, Germany, capacity 300 ± 0.05 kg) following a standard technique (Cameron N, 2004).

Secondary measurements

Body fat. Was estimated with a SECA MBCA electrical bioimpedance equipment (Medical Body Composition Analyzer, SECA gmbh & Co. Kg Hammer Steindamm 9-25).

Body size measurements. Height was measured with a SECA stadiometer, model 284 (Seca Gmbh & Co. Hammer Steindamm 9-25, Germany, Capacity 30-220 cm). The waist circumference was measured at the umbilical level with a fiberglass anthropometric tape (GÜLICK, 0 to 150 cm) (Cameron N, 2004).

Blood pressure. Measurement was performed in duplicate using a digital sphygmomanometer (Omrom, model HEM-907XL) following the technique proposed by the American College of Cardiology (ACC) / American Heart Association (AHA) (Whelton *et al*., 2017).

Analysis of biochemical parameters. The biochemical parameters to be measured were the following: fasting glucose, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL, triglycerides. The biochemical parameters tests of the study were conducted in the Laboratory of Clinical Biochemistry of Medicine of the University of Sonora using standardized techniques (RANDOX®, Crumlin, UK).

Health-related quality of life. It was evaluated with the SF-36 survey (Zúniga *et al*., 1999).

Percentage of retention / attrition of participants. The retention percentage was obtained by dividing the people who attended for the 8-week measures among those who started the intervention multiplied by 100. The dropout percentage was obtained by the difference in the number of subjects who started and finished the intervention divided by the number of subjects who started the intervention.

Other measurements

Sociodemographic variables. Sociodemographic variables measured included: age, gender, employment and marital status, educational level and approximate monthly household income. These were measured using a questionnaire through a video call.

ANNEX 1 REFERENCES

Boutelle, K. 2006. Weighing the evidence: Benefits of regular weight monitoring for weight control. Journal of Nutrition Education and Behavior. 38, 131.

Cioffi, I., Evangelista, A., Ponzo, V., Ciccone, G., Soldati, L., Santarpia, L., Contaldo, F., Pasanisi, F., Ghigo, E. and Bo, S. 2018. Intermittent versus continuous energy restriction on weight loss and cardiometabolic outcomes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Translational Medicine. 16, 371-371.

De Cabo, R. and Mattson, M. P. 2019. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. The New England Journal of Medicine. 381, 2541-2551.

Great Britain Panel on Dietary Reference. 1991. Dietary reference values for food energy and nutrients for the united kingdom: Report of the panel on dietary reference values of the committee on medical aspects of food policy. Reports of Health and Social Subjects.

Harris, L., Hamilton, S., Azevedo, L. B., Olajide, J., De Brun, C., Waller, G., Whittaker, V., Sharp, T., Lean, M., Hankey, C. and Ells, L. 2018. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults: A systematic review and meta-analysis. JBI Database for Systematic Reviews and Implementation Reports. 16, 507-547.

Hauspie R. C., Cameron N, and Molinari L. 2004. Methods in human growth research. Cambridge University Press.

Hirsh, S. P., Pons, M., Joyal, S. V. and Swick, A. G. 2019. Avoiding holiday seasonal weight gain with nutrient-supported intermittent energy restriction: A pilot study. Journal of nutritional science. 8, e11-e11.

Hoffmann, T. C., Glasziou, P. P., Boutron, I., Milne, R., Perera, R., Moher, D., Altman, D. G., Barbour, V., Macdonald, H., Johnston, M., Lamb, S. E., Dixon-Woods, M., Mcculloch, P., Wyatt, J. C., Chan, A.-W. and Michie, S. 2014. Better reporting of interventions: Template for intervention description and replication (tidier) checklist and guide. The BMJ. 348, g1687.

Hutfless, S., Gudzune, K. A., Maruthur, N., Wilson, R. F., Bleich, S. N., Lau, B. D., Fawole, O. A., Anderson, C. a. M. and Segal, J. 2013. Strategies to prevent weight gain in adults: A systematic review. American Journal of Preventive Medicine. 45, e41-e51.

Kaviani, S., Vandellen, M. and Cooper, J. A. 2019. Daily self-weighing to prevent holiday-associated weight gain in adults. Obesity. 27, 908-916.

Lemmens, V. E. P. P., Oenema, A., Klepp, K. I., Henriksen, H. B. and Brug, J. 2008. A systematic review of the evidence regarding efficacy of obesity prevention interventions among adults. Obesity Reviews. 9, 446-455.

Liu, K., Liu, B. and Heilbronn, L. K. 2020. Intermittent fasting: What questions should we be asking? Physiology & Behavior. 218, 112827.

Lombard, C. B., Deeks, A. A. and Teede, H. J. 2009. A systematic review of interventions aimed at the prevention of weight gain in adults. Public Health Nutrition. 12, 2236-2246.

Mason, F., Farley, A., Pallan, M., Sitch, A., Easter, C. and Daley, A. J. 2018. Effectiveness of a brief behavioural intervention to prevent weight gain over the christmas holiday period: Randomised controlled trial. The BMJ. 363, k4867.

Norma Oficial Mexicana 2013. NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación.

Orehek, E., Vazeou-Nieuwenhuis, A., Quick, E. and Weaverling, G. C. 2017. Attachment and self-regulation. Personality and Social Psychology Bulletin. 43, 365-380.

Organización Mundial de la Salud 2020. Brote de enfermedad por coronavirus (covid-19): Orientaciones para el público.

Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., Depalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., Maclaughlin, E. J., Muntner, P., Ovbiagele, B., Smith, S. C., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., Williamson, J. D. and Wright, J. T. 2017. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APHA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults. Hypertension. 71, e13-e115.

Zúniga, M. A., Carrillo-Jiménez, G. T., Fos, P. J., Gandek, B. and Medina-Moreno, M. R. 1999. Evaluación del estado de salud con la encuesta sf-36: Resultados preliminares en méxico. Salud Pública de México. 41, 110-118.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Medidas corporales lineales para predecir el peso vivo de cabras criollas en el noreste de México

Linear body measures to predict the live weight of creole goats in Northeastern of Mexico

Jorge Alva-Pérez[1], Ivonne Ceballos-Olvera[1], Gerardo N. Rosales-Martínez[1], Gregorio Alvarez-Fuentes[2] and Luz Y. Peña-Avelino[1]*

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Carretera a Cd. Victoria a Mante, km 5.5 87000. Cd. Victoria, Tamaulipas. México.

[2] Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. De Altaír 200 Col. del Llano 78377. San Luis Potosí, San Luis Potosí. México.

ABSTRACT

Linear body measurements (LBM) can be used to develop selection criteria for breeding animals. They are an indirect way to estimate live weight (BW) in some herbivores. The objective of this study was to obtain a formula to estimate the BW of unscaled female goats from five MCLs. Body length (CL), thoracic perimeter (TP), rump width (WG), rump height (HH), withers height (HC) and PV with scale were recorded in 206 Creole goat females from the Altiplano region (RA) and San Fernando Valley (SFVR) at Tamaulipas state. Student's t-tests for comparison of means, Pearson correlations and generalized linear models were performed to obtain multiple regressions. Goats from the RVSF presented lower LC and AC compared to those from the RA (P<0.01). Correlations in both districts were positive and significant. The proposed formula for PV estimation in the RA was (0.80 × PT) -29.83 and for the RVSF (0.89 × PT)-37.30. No differences were observed between the live weight obtained with scale (PVB) and the estimated live weight (PVE).

Keywords: body trait; morphological trait; zoometry, prediction formula.

RESUMEN

Las medidas corporales lineales (MCL) se pueden utilizar para desarrollar criterios de selección de animales de cría. Estas son una forma indirecta de estimar el peso vivo (PV) en algunos herbívoros. El objetivo de este estudio fue obtener una fórmula que permita estimar el peso vivo de hembras (PVH) caprinas sin báscula (PVH) a partir de cinco MCL. Se registró la longitud corporal (LC), perímetro torácico (PT), anchura de la grupa (AG), altura de la grupa (ALG), altura de la cruz (AC) y PV con báscula (PVB) en 206 hembras caprinas criollas de la región del Altiplano (RA) y el Valle de San Fernando (RVSF) del estado de Tamaulipas. Se realizaron pruebas "t" de Student para la comparación de medias, correlaciones de Pearson y modelos lineales generalizados para obtener regresiones múltiples. Las cabras del RVSF presentaron una menor LC y AC comparada con las del RA (P < 0.01). Las correlaciones en ambos distritos fueron positivas y significativas. La fórmula propuesta para la estimación del PVH en la RA fue (0.80 × PT) -29.83 y para el RVSF (0.89 × PT)-37.30. No se observaron diferencias entre el PVH y el peso vivo estimado (PVE).

Palabras clave: rasgos corporales, rasgos morfológicos, zoometría, formula de predicción.

INTRODUCCIÓN

Las medidas corporales lineales (MCL) se pueden usar como indicadores del crecimiento animal (Asamoah-Boaheng y Sam, 2016). Las MCL sirven para desarrollar criterios de selección para animales de cría. Además, constituyen una forma indirecta de medir las dimensiones y estimar el peso vivo (PV) (Dorantes-Coronado *et al.*, 2015). La producción caprina en México ha estado relacionada con la pobreza extrema (Mellado, 1997). Esta se caracteriza por utilizar tecnologías limitadas o ausentes (Vázquez-Rocha *et al.*, 2019). En Tamaulipas, los sistemas de producción caprina son de tipo extensivo y tienen una dependencia, casi exclusiva, por los matorrales y pastos nativos. Al mismo tiempo, los registros productivos son casi inexistentes (Alva-Pérez *et al.*, 2019). En las unidades productivas son necesarias las estimaciones del PV para realizar buenas prácticas de manejo, por ejemplo: dosificación de medicamentos o aplicación de antiparasitarios. También es un parámetro usado en la selección de ejemplares, determinación del inicio de la pubertad y el establecimiento del precio de venta de animales, pero en la mayoría de las ocasiones dicha estimación se realiza solo de forma visual y subjetiva (Agamy *et al.*, 2015). En algunas regiones del mundo se ha propuesto la estimación del PVH caprina mediante el uso de cintas métricas, los investigadores han propuesto hasta la inclusión de nueve MCL (longitud corporal (LC), longitud torácica (LT), altura a la cruz (AC), perímetro torácico (PT), anchura de la grupa (AG), longitud de la grupa (LG), longitud de la cabeza (LCA), ancho de la cabeza (ACA), y largo de la oreja (LO) (Tsegaye, Belay and Haile, 2013; Younas *et al.*, 2013; Dorantes-Coronado *et al.*, 2015. En contraste, otros trabajos usan solo tres (LC, AC y PT) (Khan *et al.*, 2006; Moaeen-ud-Din *et al.*, 2006). El uso de las MCL representan una ventaja porque las cintas métricas son de fácil acceso, económicas, además, el manejo de los animales tiene mínima invasión y son de bajo riesgo (Chacón *et al.*, 2011; Chacón-Hernández y Boschini-Figueroa, 2017). Nuestra hipótesis fue que era

*Autor para correspondencia: Luz Y. Peña Avelino
Correo-e: lypena@docentes.uat.edu.mx
Recibido: 30 de agosto de 2023
Aceptado: 8 de mayo de 2024
Publicado: 7 de junio de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2138

posible estimar el PVH a partir de una fórmula matemática que utilizara las MCL. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo la obtención de una fórmula que permita estimar el PV sin báscula de hembras caprinas a partir de cinco MCL, provenientes de dos zonas agroecológicas, del estado de Tamaulipas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de la investigación

Se realizó un muestreo no probabilístico de conveniencia en 16 unidades de producción caprina (UP) de las regiones del Altiplano tamaulipeco, (RA, n =107 hembras) y Valle de San Fernando, (RVSF, n = 99 hembras). El sistema de manejo de la producción caprina de Tamaulipas se caracteriza por ser de pastoreo diurno y confinamiento nocturno, no obstante, existen diferencias agroecológicas entre los distritos. Son sistemas mixtos que se caracterizan por la producción de carne (cabrito) y leche (Tabla 1) y (Figura 1).

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión: hembras adultas de 2 y 3 años no preñadas. Los criterios de exclusión: hembras lactantes o gestantes de la misma edad.

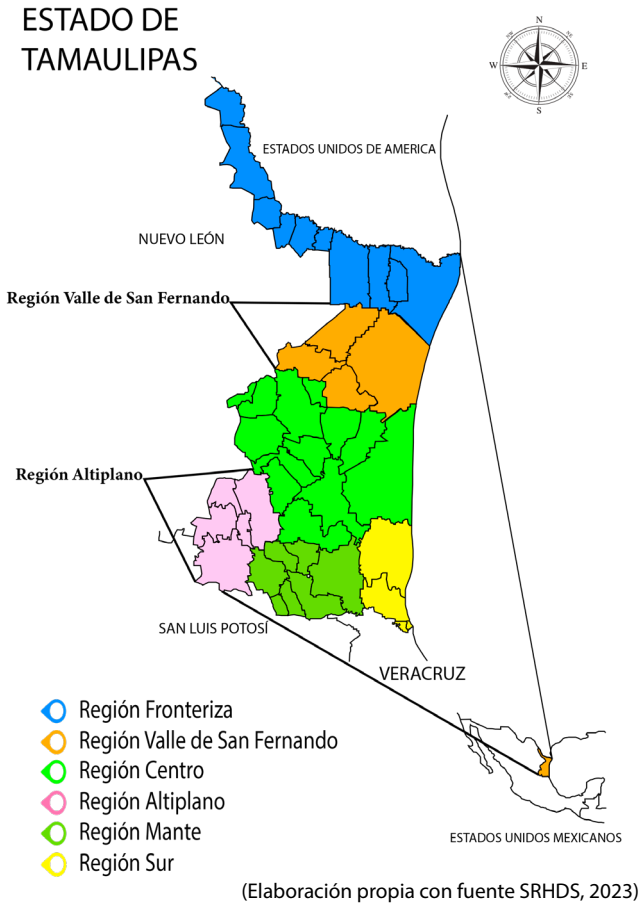
Toma de medidas y PV

La determinación fue realizada a las 08:00 horas, antes de realizar el pastoreo (Yakubu *et al.*, 2011). Las MCL se obtuvieron según lo descrito por Chacón *et al.* (2011) y la FAO (2012): longitud del cuerpo (LC), perímetro torácico (PT), altura de la grupa (ALG), anchura de la grupa (AG) y altura de la cruz (AC) usando una cinta métrica flexible. La toma de datos fue realizada por la mañana (07:00 horas) antes del pastoreo en una sola ocasión por unidad productiva. El peso vivo de la hembra con báscula (PVB) se obtuvo mediante una balanza digital de 150 kg de capacidad y 150 g de precisión (L. Noval SA de CV, México).

Tabla 1. Características climáticas, altitud sobre el nivel del mar, especies forrajeras predominantes, y número de cabras en la región del altiplano (RA) y la región del valle de San Fernando (RVSF) del estado de Tamaulipas.
Table 1. Climatic characteristics, altitude above sea level, predominant forage species, and number of goats at the Altiplano region (RA) and the Valle de San Fernando region (RVSF) of the Tamaulipas state.

Características	RA	RVSF
Temperatura °C	10-24	20-24
Latitud	23° 53′ - 23° 04′ N	25° 27′-24° 19′ N
Longitud	99° 41′- 99° 10′W	98° 26′- 97° 31′W
Vegetación	Bosque (47.9%), Matorral (39%), selva (5%), pastizal (1%)	Matorral (29.5%), selva (1%), pastizal (1%)
Precipitación (mm)	400 -1100	500-800
Altitud (msnm)	300-3200	50-300
Población caprina	50,000	34,748
Cultivos mayoritarios	Ajo, avena forrajera, calabacín, cebolla, chile verde, maíz en grano, patata, pepino, sorgo en grano y tomate rojo	Frijol, sorgo de grano y trigo de grano
Especies ganaderas	Bovinos, ovinos, cerdos y aves	Bovinos, ovinos, cerdos y aves

Fuente(INEGI, 2009).



(Elaboración propia con fuente SRHDS, 2023)

Figura 1. Regiones del estado de Tamaulipas.
Figure 1. Regions of the state of Tamaulipas.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas "t" de Student para la comparación de medias (Herrera-Haro y García-Artiga, 2019) con el fin de comprobar si existían diferencias en las medias de PVH y MCL entre RA y RVSF. Se obtuvieron las medias, desviaciones estándar, máximos y mínimos y el coeficiente de variación (%). Además, se estimó la matriz de correlación de Pearson (PROC CORR) para el PVH y las MCL. A continuación, para obtener las ecuaciones de predicción de las variables altamente correlacionadas con el PVH, se utilizó el procedimiento de modelos lineales generalizados (PROC GLM) para obtener una regresión múltiple (PROC STEPWISE y Forward selección) con el programa Statistical Analysis System Version 9.0. Posteriormente, se compararon los valores del peso vivo por báscula (PVB) con los pesos vivos estimados (PVE), mediante el PROC TTEST.

RESULTADOS Y DISCUSION

Peso vivo

No se observó diferencia en el PVH (P > 0,05) entre los dos distritos RA y RVSF (Tabla 2). La media del peso vivo fue de

Tabla 2. Medias ± desviación estándar, valores de mínimos y máximos, y porcentaje de coeficiente de variación (CV) de cabras criollas en Tamaulipas.
Table 2. Means ± standard deviation, minimum and maximum values, and coefficient of variation percentage (CV) of criollo goats in Tamaulipas.

	RA	Max	Min	CV	RVSF	Max	Min	CV	EE	P-valor
PV	30.26 ± 5.9	45.62	15.3	19.82	29.95 ± 6.6	50.0	18.0	22.34	6.34	0.7263
PT	74.55 ± 5.1	85.0	60.5	6.90	74.55 ± 6.0	92.0	60.0	8.14	5.62	0.6768
AC	66.85 ± 3.7[a]	75.0	54.0	5.50	64.86 ± 4.5b	75.0	55.0	7.02	4.12	0.0007
LC	62.20 ± 4.8[a]	85.0	49.5	7.84	60.10 ± 4.8b	74.5	50.0	8.01	4.84	0.0021
AG	14.42 ± 1.1	18.0	11.0	8.03	14.68 ± 1.6	18.0	11.0	11.19	1.14	0.1918
ALG	66.89 ± 3.6	77.0	58.0	5.45	66.89 ± 5.0	80.0	54.5	7.47	4.35	0.9957

[a,b]: medias en la misma fila con diferente son diferentes a $P < 0.05$.
EE: error estándar; RA: Región del Altiplano; RVSF: Región del Valle de San Fernado; PVH: Peso vivo de la hembra; PT: perímetro torácico; AC: altura de la cruz; LC: longitud corporal; AG: anchura de la grupa; ALG: altura de la grupa.

30.26 ± 5.9 kg. La influencia de las razas Nubia, Saanen, Boer y Toggenburg, en ambas regiones de Tamaulipas, prevalecieron sobre las condiciones agroecológicas al no observarse diferencias en el PVH (Vázquez-Rocha *et al.*, 2019). El PVH coincide con el peso reportado a nivel nacional (Dorantes *et al.*, 2015) e internacional (Khan *et al.*, 2006; Moaeen-ud-Din *et al.*, 2006). Por otra parte, se han registrado pesos más ligeros en cabras de raza Red Sokoto y West African Dwarf (WAD) de Nigeria (Okpeku *et al.*, 2011), así como en cabras Mubende, Teso y Lungware de África oriental (Semakula *et al.*, 2010) y cabras criollas (16 kg) de Venezuela (Pariacote *et al.*, 2004). En contraste, Villarreal-Arellano *et al.* (2018) observaron pesos de 48 kg en las cabras blancas pastoreñas de Oaxaca, esto fue mayor a lo reportado en esta investigación. Estas comparaciones ponen de manifiesto la diversidad del potencial de las razas sobre el peso vivo, así como diversos factores que influyen de forma decisiva: el manejo de los animales (tiempo de pastoreo, tipo de sistema de producción y salud), la actividad física (distancia a los abrevaderos, lugares de resguardo) y los factores agroecológicos (humedad, temperatura, disponibilidad de alimentos).

Medidas Corporales Lineales

El LC y el AC fueron más bajos en los animales de RVSF que en los de RA, sin diferencias en otras MCL (Tabla 2). Los animales RA tienen un mayor AC y LC, posiblemente por la influencia de la raza Nubia, al ser animales longilíneos con menos corpulencia y robustez que las razas cárnicas. Al comparar los resultados con otros de Argentina, Brasil y México (Lanari *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2013; Dorantes *et al.*, 2015) los valores de AC son similares. No obstante, también hay valores inferiores en estudios realizados en Brasil, África y Pakistán (Moaeen-ud-Din *et al.*, 2006; Semakula *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2013). Desde el punto de vista racial, los valores de AC más altos se reportaron en la Alpina, Saanen, Toggenburg, Nubia, Boer y Drâa de Brasil (Pires *et al.*, 2013).

Los valores de LC de las cabras criollas tamaulipecas son similares a los encontrados en Etiopía e India (Hassen *et al.*, 2012; Khargharia *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, se han encontrado valores de LC más bajos en estudios realizados en África (Pariacote *et al.*, 2004; Semakula *et al.*, 2010). Los valores fueron más altos para esta medida zoométrica en estudios realizados en Venezuela y México (Estado de México y Oaxaca) (Pariacote *et al.*, 2004; Dorantes *et al.*, 2015) que en nuestro estudio. En general, las diferencias en la MCL pueden explicarse parcialmente por el efecto de la selección natural o artificial de la unidad de producción (Dorantes-Coronado *et al.*, 2015). Además, la genética y las condiciones ambientales en las que se desarrollan las cabras influyen en la diferenciación de los grupos de cría (Okpeku *et al.*, 2011). La disponibilidad de alimentos es otro factor que influye en la morfología de los animales y afecta la expresión del potencial productivo.

Correlaciones

El PVH tuvo una asociación alta y positiva con las MCL (r= 0.81-0.50, P <0,0001) de las cabras RA (Tabla 3). Mientras que en las cabras del RVSF, las asociaciones con el PT, AC y AG fueron medianas y positivas (r= 0.69-0.39, P <0,0001) y positivas bajas para LC y ALG (r= 0. 34-0.35 a 62 P <0,01). Las correlaciones MCL permiten determinar el grado de armonía morfoestructural de cada animal, es decir, la importancia del equilibrio se determina según el número de correlación obtenido (Herrera y Luque, 2009; Pares, 2015). Por lo anterior, en ambas regiones las hembras caprinas criollas tienen una alta armonía morfoestructual, pues supera el 50% del número total de correlaciones positivas significativas. En el presente estudio se observó alta asociación de PT con PVH de manera

Tabla 3. Matriz de correlaciones entre el peso vivo y medidas corporales lineales de las cabras criollas de RVSF (por encima de la diagonal) y RA (por debajo de la diagonal), del Estado de Tamaulipas.
Table 3. Correlations matrix between live weight and linear body measurements of Creole goats from RVSF (above the diagonal) and RA (below the diagonal), from the Tamaulipas state.

	PVH	PT	AC	LC	AG	ALG
PVH		0.81***	0.57***	0.77***	0.75***	0.60***
PT	0.69***		0.58***	0.75***	0.73***	0.53***
AC	0.43***	0.48***		0.53***	0.63***	0.62***
LC	0.35**	0.36***	0.30**		0.69***	0.50***
AG	0.39***	0.54***	0.39***	0.26**		0.61***
ALG	0.34**	0.48***	0.59***	0.22*	0.41***	

*$P < 0.05$; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.0001$.
RA: Región del Altiplano; RVSF: Región del Valle de San Fernado, PVH: peso vivo de la hembra; PT: perímetro torácico; AC: altura a la cruz; LC: longitud del cuerpo; AG: anchura de la grupa; ALG: altura de la grupa.

con otros trabajos realizados en México (Dorantes *et al.*, 2015; Dorantes-Coronado *et al.*, 2015), y en otros países (Okpeku *et al.*, 2011; Younas *et al.*, 2013; Agamy *et al.*, 2015). La estructura ósea, muscular y grasa contribuye a la formación del PT, que es utilizado frecuentemente para estimar el peso vivo de la cabra (Leng *et al.*, 2010; Bello and Adama, 2012) y ovejas (Mahmud, Shaba and Zubairu, 2014), y están en consonancia con los resultados de la presente investigación.

Ecuaciones de peso vivo

El PT es la MCL que explica el modelo de regresión lineal simple en todos los modelos (Tabla 4). En RA, el coeficiente de determinación de ajuste fue adj-R^2 = 0.47, en cambio, para RVSF fue adj-R^2 = 0.66 y con la selección hacia adelante fueron 0.48 y 0.74, respectivamente. Sin embargo, la inclusión de otras medidas zoométricas asociadas al peso, como el LC (Okpeku *et al.*, 2011; Agamy *et al.*, 2015; Dorantes *et al.*, 2015), AC, ALG (Semakula *et al.*, 2010; Agamy *et al.*, 2015); y AG (Okpeku *et al.*, 2011; Agamy *et al.*, 2015), incrementa la fiabilidad del modelo de predicción. Asimismo, el mejor modelo de predicción para las regiones (RA y RVSF) y el modelo general (RA+RVSF) se obtuvo utilizando la ecuación de regresión múltiple (adj-R^2= 0.74), que incluía PT, LC y ALG (Tabla 4). El resultado de R^2 superior al 70% sugiere que los productores que no disponen de básculas para pesar a los animales pueden estimar el peso vivo de sus cabras (Dorantes-Coronado *et al.*, 2015).

Para la predicción de PVH en animales de RA, la fórmula propuesta es: (0.80 × PT) -29.83. Para la RVSF, la fórmula propuesta es: (0.89 × PT) -37.30. Al usar las fórmulas propuestas no se observaron diferencias entre los pesos vivos obtenidos por báscula y los pesos vivos estimados con fórmulas (Tabla 5). De acuerdo con nuestros resultados, Perez *et al.* (2016) encontraron que las fórmulas son un instrumento fácil para estimar el PV. Además, para obtener una fórmula más sencilla es posible el redondeo de los decimales y sustituir por números enteros (Perez *et al.*, 2016). Por lo tanto, utilizar una cinta métrica flexible, en lugar de una báscula en condiciones de campo, es el método más sencillo y práctico, pues se requiere un menor esfuerzo para inmovilizar al ganado caprino. Además, el estrés ejercido en los animales es reducido.

Tabla 5. Medias y diferencias entre el peso vivo con báscula (PVB) y el peso vivo estimado (PVE).
Table 5. Means and differences between live weight with scale (PVB) and estimated live weight (PVE).

Región	PVB	PVE			EE	P-valor
		FL	FS1	FS2		
Altiplano	30.26	29.05	29.60	29.22	4.90	0.3327
Valle de San Fernando	29.95	29.34	28.76	28.54	5.86	0.2803

[a,b]: medias en la misma fila con diferente son diferentes a P <0.05; EE: error estándar; FL: regresión lineal ; FS1: Forward selección 1; FS2: Forward selección 2.

CONCLUSIONES

Los caprinocultores del noreste de México pueden estimar el peso vivo de las cabras utilizando una cinta métrica flexible. El perímetro torácico posee una alta correlación con el peso vivo en las cabras criollas Tamaulipecas y puede ser usada para predecir el peso vivo. Otras medidas corporales lineales como la longitud del cuerpo, la altura de la grupa y la altura a la cruz fortalecen el modelo de predicción. Los modelos lineales propuestos son de fácil aplicación en campo y no causan diferencia entre el peso vivo estimado por una báscula digital y el peso vivo estimado por ecuaciones de predicción.

Declaraciones

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité y Consentimiento Ético de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Tamaulipas (número de referencia CBBA-03-2020) en cumplimiento de la Ley de Protección Animal promulgada por México.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente estudio expresan su agradecimiento a los productores de ganado caprino que permitieron el acceso a sus unidades de producción. Es importante mantener la vinculación entre la academia y los productores con el fin de fortalecer las innumerables actividades en el sector caprino.

Tabla 4. Ecuaciones de prediccción por regiones: Región del altiplano (RA) y Región del Valle de San Fernando (RVSF) del estado de Tamaulipas.
Table 4. Prediction equations by regions: Altiplano region (RA) and Valle de San Fernando region (RVSF) of the state of Tamaulipas.

Región		Ecuación	βo	β1	β2	β3	SE	R^2	Adj- R^2	MSE
RA	Lineal	HG	-29.83	0.80			6.12	0.47	0.47	4.34
	Forward selección 1	HG+WH	-38.41	0.73	0.20		8.11	0.49	0.48	4.31
	Forward selección 2	HG+WH+BL	-41.74	0.70	0.18	0.12	9.11	0.50	0.48	4.30
RVSF	Lineal	HG	-37.30	0.89			4.81	0.66	0.66	3.86
	Forward selección 1	HG+BL	-44.86	0.59	0.49		4.75	0.72	0.72	3.55
	Forward selección 2	HG+BL+RH	-52.64	0.52	0.43	0.25	5.19	0.74	0.74	3.40

RA: Región del Altiplano; RVSF: Región del Valle de San Fernado; R^2: Coeficiente de determinación; Adj- R^2: adjusted; MSE: mean square error; EE: error standard; PT: perímetro torácico; AC: altura de la cruz; LC: longitud corporal; AG: anchura de la grupa; ALG: altura de la grupa.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

REFERENCIAS

Agamy, R. Abdel-Moneim, A.Y., Abd-Alla, M.S., Abdel-Mageed, I.I., y Ashmawi, G.M. 2015. 'Using linear body measurements to predict body weight and carcass characteristics of three Egyptian fat-tailed sheep breeds', Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 10(7): 335–344. Available at: https://doi.org/10.3923/ajava.2015.335.344.

Alva-Pérez, J, López-Corona, L.E, Zapata-Campos, C.C., Vázquez-Villanueva, J., y Barrios-García, H.B. 2019. Condiciones productivas y zoosanitarias de la producción caprina en el altiplano de Tamaulipas, México, Interciencia. 44(3): 154–160.

Asamoah-Boaheng, M. y Sam, E.K. 2016. Morphological characterization of breeds of sheep: a discriminant analysis approach, SpringerPlus. 5(1): 1–12. Available at: https://doi.org/10.1186/s40064-016-1669-8.

Bello, A.A. y Adama, T.Z. 2012. Studies on body weight and linear body measurements of castrates and non-castrate savannah brown goats, Asian Journal of Animal Sciences. 6(3): 140–146. Available at: https://doi.org/10.3923/ajas.2012.140.146.

Chacón-Hernández, P. y Boschini-Figueroa, C. 2017. Peso estimado en cabras con una cinta comercial de pesaje y perímetro torácico. Agronomía Mesoamericana, 28(1): 229–236. Available at: https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21611.

Chacón, E., Macedo, F., Velázquez, F., Paiva, S.R., Pineda, E., y McManus, C. 2011. Morphological measurements and body indices for Cuban Creole goats and their crossbreds. Revista Brasileira de Zootecnia. 40(8): 1671–1679. Available at: https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000800007.

Dorantes-Coronado, E.J., Torres-Hernández, G., Hernández-Mendo, O., y Rojo-Rubio, R. 2015. Zoometric measures and their utilization in prediction of live weight of local goats in southern México, SpringerPlus, 4(1): 1–8. Available at: https://doi.org/10.1186/s40064-015-1424-6.

Dorantes, C. Gómez, T.G., Jasso, A.X., Mondragón, A.J., y García, H.P. 2015. Utilización de las medidas zoométricas para predecir el peso corporal en cabras criollas , en el sur del estado de México, Actas Iberoamericanas de Coservación Animal, 6(1): 525–534.

FAO. 2012. Phenotypic characterization of animal genetic resources, FAO Animal Production and Health Guidelines. Roma, Italia: Food and Agriculture Organizaton of the United Nations.

Hassen, H. et al. 2012. 'Phenotypic characterization of Ethiopian indigenous goat populations', African Journal of Biotechnology. 11(73): 13838–13846. Available at: https://doi.org/10.5897/ajb12.2092.

Herrera-Haro, J. y García-Artiga, C. 2019. Bioestadística en ciencias veterinarias: Procedimientos de análisis de datos con SAS. Texcoco, México: Diamante.

Herrera, M. y Luque, M. 2009. Morfoestructura y sistemas para el futuro de la valoración morfológica. En C. Sañudo (ed.) Valoración morfológica de los animales domésticos. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino., pp. 79–102.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Mexico.

[Consultado 10 mayo 2023]. Disponible en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/28/28017.pdf

Khan, H. Muhammad, F., Ahmad, R., Nawaz, G., Rahimullan y Zubair, M. 2006. Relationship of body weight with linear body measurements in goats. Journal of Agricultural and Biological Sciences. 1(3): 51–54.

Khargharia, G. Kadirvel, G,, Kumar, S., Doley, S., Bharti P.K. y Das M. 2015. Principal component analysis of morphological traits of Assam hill goat in eastern Himalayan India. Journal of Animal and Plant Sciences. 25(5): 1251–1258.

Lanari, M.R.M.R. Taddeo, H., Domingo, E., Centeno, M.P. y Gallo L. 2003. Phenotypic differentiation of exterior traits in local Criollo goat population in Patagonia (Argentina). Arch. Tierz Dummerstorf, 46(4): 347–356. Available at: https://doi.org/10.5194/aab-46-347-2003.

Leng, J. Ren-jun Z., Guo-rong Z., Qing-ran, Y. y Hua-ming, M. 2010. Quantitative and qualitative body Traits of longling yellow goats in China. Agricultural Sciences in China. 9(3): 408–415. Available at: https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60111-5.

Mahmud, M.A., Shaba, P. y Zubairu, U.Y. 2014. Live body weight estimation in small ruminants-A review, Global Journal of Animal Scientifc Research. 2(2):102–108.

Mellado, M. 1997. La cabra criolla en América Latina. Veterinaria México. 28(4): 333–43.

Moaeen-ud-Din, M., Ahmad, N., Iqbal, A. y Abdullah M. 2006. Evaluation of different formulas for weight estimation in Beetal, Teddi and crossbred (Beetal X Teddi) goats', Journal of Animal and Plant Sciences. 16(3–4): 74–78.

Okpeku, M., Yakubu, A., Peters, S.O., Ozoje, M.O., Ikeobi, C.O.N., Adebambo, O.A. y Imumorin, I.G. 2011. Application of multivariate principal componet analysis to morphological characterization of indigenous goats in Southern Nigeria. Acta Agriculturae Slovenica. 98(2): 101–109. Available at: https://doi.org/10.2478/v10014-011-0026-4.

Pares, C.P.. 2015. Body weight is an important trait for compararision of goat breeds. Iranian Journal of Applied Animal Science, 5(2): 463–466.

Pariacote, F.A., Ruiz, L., Ascencao, D.C.D., y Pimentel, C.B.X. 2004. Características morfológicas del caprino Criollo venezolano', Archivos Latinoamericanos en Producción Animal. 12(1):16–21.

Perez, Z.O., Ybañez, A.P., Ybañez, R.H.D., Fritz, J., y Sandoval, G.J. 2016. Body weight estimation using body measurements in goats (*Capra hircus*) under field condition', Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences. 42(1): 1–7.

Pires, L.C., Machado, T.M.M., de Araújo, A.M., da Silva, J.B.L., Euclydes, R.F., da Silva Costa, M, y Olson, T.A. 2013. Cluster evaluation of brazilian and moroccan goat populations using physical measurements', Revista Brasileira de Zootecnia. 42(10): 713–720. Available at: https://doi.org/10.1590/S1516-35982013001000004.

Semakula, J., Mutetikka, D., D. K.R. y Mpairwe, D. 2010. Variability in body morphometric measurements and their application in predicting live body weight of Mubende and small East African goat breeds in Uganda', Middle-East Journal of Scientific Research, 5(2): 98–105.

SRHDS. Secretaría de Recursos Hidráulicos para el Desarrollo Social. Gobierno del Estado de Tamaulipas 2022-2028. Regiones del estado de Tamaulipas. (Consultado el 10 de febrero de 2023) Disponible en: https://www.tamaulipas.gob.mx/recursoshidraulicos/sector-agua/regiones/)

Tsegaye, D., Belay, B. y Haile, A. 2013. Linear body measurements as predictor of body weight in hararghe highland goats under farmers environment: Ethiopia', Global Veterinaria, 11(5): 649–656. Available at: https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.11.5.76135.

Vázquez-Rocha, L. Peña-Avelino, L.Y., Limas-Martínez, A.G., Lucero-Magaña, F. A. y López-Aguirre, D. 2019. Pastoreo del ganado caprino en el Altiplano de Tamaulipas', Transversalidad Cientifica y Tecnologica, 3(2):109–120.

Villarreal-Arellano, H.R. Fuentes-Mascorro, G., Ramírez-Bribiesca, J.E., Torres-Hernández, G. y Domínguez-Martínez, M. 2018. Modelo morfoestructural en la cabra criolla pastoreña de la region mixteca del estado de Oaxaca, México', Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, 12(1): 155–163.

Yakubu, A., Ladokun, A.O. y Adua, M.M. 2011. Bioprediction of body weight from zoometrical traits of non-descript goats using linear and non-linear models in north central nigeria. Livestock Research for Rural Development, 23(6): 130.

Younas, U. Abdullah, M., Bhatti, J.A., Pasha, T.N., Ahmad, N., Nasir, M. y Hussain, A. 2013. Inter-relationship of body weight with linear body measurements in hissardale sheep at different stages of life. The Journal of Animal and Plant Sciences. 23(1): 40–44.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Primer registro de lesiones epiteliales sugerentes de fibropapilomatosis en tortugas Golfinas (*Lepidochelys olivacea*) anidadoras en Baja California Sur, México

First record of epithelial lesions suggestive of fibropapillomatosis in nesting olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) in Baja California Sur, Mexico

Alexei Vega Hernández[1,2], Helena Fernández-Sanz[2,3,4], Abilene Colin[5], Agnese Mancini[6], José Alfredo Guevara-Franco[7] and Eduardo Reséndiz[2,4,8*]

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México, México.
[2] Health Assessments in Sea Turtles from Baja California Sur (HastBCS), Villa de los Algodones 276, Col. Villas del Encanto, C.P. 23085, La Paz, Baja California Sur, México.
[3] Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras, Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Carretera al sur Km 5.5, Col. El Mezquitito, C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.
[4] Honu Kai A.C., Mar quieto 330, Col. Miramar, C.P. 23085, La Paz, Baja California Sur, México.
[5] ASUPMATOMA A.C. Blvd. Marina SN, Plaza Mariachis Local 24. Centro, C.P. 23450, Cabo San Lucas, Baja California Sur, México.
[6] Grupo Tortuguero de las Californias A.C., Calle 6 141, Col. Las Azaleas, C.P. 23098, La Paz, Baja California Sur, México.
[7] Departamento Académico de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat, Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Carretera al sur Km 5.5, Col. El Mezquitito, C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.
[8] Laboratorio de Investigación y Medicina de Organismos Acuáticos, Departamento Académico de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat, Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Unidad Académica Pichilingue, Carretera La Paz-Pichilingue km. 16.5 La Paz Baja California Sur, México.

RESUMEN

En este estudio, se identificaron y caracterizaron macroscópicamente lesiones proliferativas epiteliales presentes en tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) anidadoras en playa El Suspiro, Baja California Sur, México, durante la temporada 2022. De junio a diciembre, se realizaron 123 recorridos diurnos y nocturnos. Durante este periodo se observaron 419 golfinas anidadoras, de las cuales 8 presentaron lesiones proliferativas epiteliales sugerentes de fibropapilomatosis. Estos 8 organismos midieron en promedio 66.43 ± 3.13 cm de largo curvo de caparazón y presentaron un total de 51 lesiones sugerentes de fibropapilomatosis, con grado 1, 2 y 3 de severidad. La prevalencia de tortugas con estas lesiones fue de 0.019 %, la tasa de incidencia de las lesiones fue de 0.069 y la incidencia acumulada fue de 0.019. La presencia de lesiones sugerentes de fibropapilomatosis en las tortugas golfinas anidadoras en esta zona indica un factor de riesgo adicional que puede contribuir al declive de las poblaciones de esta especie. La información generada sustenta la importancia de incluir las evaluaciones de salud en los monitoreos de tortugas marinas en México, ayuda a fortalecer los planes de manejo y a desarrollar nuevas estrategias de conservación para estos organismos y sus hábitats.

Palabras clave: Anidación; Fibropapilomatosis; Pacífico oriental; Tortugas marinas; Tumores**.**

ABSTRACT

In this study, epithelial proliferative lesions were macroscopically identified and characterized in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, Baja California Sur, Mexico, during the 2022 nesting season. From June to December, 123 day and night surveys were carried out. During this period, 419 nesting female olive ridleys were observed, of which 8 presented epithelial proliferative lesions suggestive of fibropapillomatosis. These 8 organisms measured an average of 66.43 ± 3.13 cm in curved carapace length and presented a total of 51 lesions suggestive of fibropapillomatosis, with score 1, 2 and 3. The prevalence of turtles with these lesions was 0.019 %, the lesion incidence rate was 0.069, and the acumulative incidence was 0.019. The presence of fibropapillomatosis-like lesions in nesting olive ridley turtles in the region, represents an additional risk factor that may contribute to the populations decline of this species. The information generated supports the importance of including health assessments in sea turtle monitoring in Mexico, helps to strengthen management plans and develop new conservation strategies for these organisms and their habitats.

Keywords: Eastern Pacific; Fibropapillomatosis; Nesting; Sea turtles; Tumors.

INTRODUCCIÓN

Considerada la especie de tortuga marina más abundante en el mundo, la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) está catalogada como vulnerable internacionalmente según la Lista Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (Abreu-Grobois y Plotkin, 2008) y en peligro de extinción en México por la Norma Ofi-

*Autor para correspondencia: Eduardo Reséndiz
Correo-e: jeresendiz77@gmail.com
Recibido: 26 de septiembre de 2023
Aceptado: 4 de abril de 2024
Publicado: de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2163

cial Mexicana-059-Semarnat-2010 (SEMARNAT, 2018). Esta especie tiene un amplio rango geográfico de distribución en aguas tropicales y subtropicales de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico. En el Pacífico oriental, la tortuga golfina se distribuye desde el noroeste de México hasta Chile, con las poblaciones reproductoras más importantes en México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica donde puede anidar de forma masiva o en solitario (Cáceres-Frías *et al*., 2022). Durante las últimas décadas, algunas poblaciones del Pacífico han experimentado descensos significativos. Junto con la captura incidental y dirigida, las amenazas infecciosas, como la Fibropapilomatosis (FP), son un factor cada vez más relevante en el declive de las poblaciones de tortugas marinas (Aguirre y Lutz, 2004; Cáceres-Frías *et al*., 2022). La FP es una enfermedad infecciosa y proliferativa asociada al alfaherpesvirus Quelonido 5 (ChHV5, por sus siglas en ingés) que puede afectar severamente a las tortugas marinas (Ackerman *et al*., 2012; Whitmore *et al*., 2021). La FP se considera multifactorial y se caracteriza por la presencia de tumores benignos únicos o múltiples denominados fibropapilomas (FPs) que se desarrollan en la superfice epitelial de las tortugas infectadas y que pueden medir desde 0.1 cm a más de 30 cm (Herbst *et al*., 1999). Se ha sugerido que el mecanismo de transmisión de FP es por contacto directo entre tortugas infectadas y tortugas susceptibles (Herbst *et al*., 1999). Aunque la FP fue descrita inicialmente en tortugas verdes (*Chelonia mydas*) (Smith y Coates, 1938), y es la especie que con mayor frecuencia se ve afectada, la enfermedad ya se ha reportado en todas las especies de tortugas marinas, incluidos los híbridos, a nivel mundial (Mashkour *et al*., 2021).

Desde 1980, la FP ha aumentado drásticamente en diferentes regiones del mundo alcanzando una prevalencia del 50 % al 92 % (Whitmore *et al*., 2021). En México, la FP se ha reportado en tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) en Rancho Nuevo, Tamaulipas (Barragán y Sarti, 1994), en tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) en la costa de Michoacán (Huerta *et al*., 2002), en tortugas golfinas en la costa de Colima y Oaxaca (Gámez *et al*., 2009; Reséndiz *et al*., 2015) y en tortugas verdes en Yucatán, Sinaloa, Veracruz y Baja California Sur (Maldonado-Gasca y Zapata, 2007; Mejía-Radillo *et al*., 2019; Suárez-Domínguez *et al*., 2020; Reséndiz *et al*., 2016; 2019; 2021). Los casos de FP en tortugas marinas en México han aumentado durante las últimas décadas, tanto en sitios de alimentación (juveniles y adultos) como en playas de anidación (hembras adultas), lo que implica un alto riesgo de infección para las diferentes poblaciones y especies de tortugas que convergen en las costas mexicanas.

Este documento presenta las primeras descripciones de lesiones proliferativas sugerentes de FP en tortugas golfinas anidadoras en Baja California Sur, un sitio clave para la anidación de la especie en el Pacífico mexicano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante los meses de junio a diciembre de 2022 se realizaron 123 recorridos duirnos y nocturnos correspondientes a las actividades regulares del programa de monitoreo de anidación de tortugas golfinas en el campamento tortuguero ASUPMATOMA A.C. en la playa El Suspiro (8 km), ubicada en el municipio de Cabo San Lucas, Baja California Sur (desde Latitud 22.934968º - Longitud -110.045411º a Latitud 22.910839º - Longitud -110.021200º). Las tortugas fueron observadas anidando; inicialmente, se registró su ubicación geográfica con la aplicación "Polaris Navigation GPS" y se registró el sector (kilómetro 1-8) y zona de la playa (A, B o C) en el que se encontraron. Denominamos zona A a la franja intermareal (hasta la línea de pleamar), zona B al área dónde la arena superficial es más seca y zona C dónde comienza la vegetación o rocas (Zavaleta-Lizárraga y Morales-Mávil, 2013).

Una vez finalizado el desove y la cobertura del nido, las tortugas fueron examinadas minuciosamente siguiendo una orientación cráneo-caudal (Paige-Karjian *et al*., 2021). Las regiones anatómicas donde se identificaron lesiones sugerentes de FP se registraron, y las lesiones se describieron macroscópicamente siguiendo los criterios propuestos por Jacobson *et al*. (1991); Aguirre *et al*. (1999); Herbst *et al*. (1999) y Reséndiz *et al*. (2015). Adicionalmente, se utilizó una cinta métrica para obtener el tamaño de la lesión, se registró su grado de severidad según las clasificaciones de Aguirre *et al*. (1999) y Work y Balazs (1999), y se tomaron fotos de las lesiones. Finalmente, se registró el largo curvo de caparazón (LCC) con una cinta métrica flexible (Bolten, 1999).

Utilizando el software R 3.6.2® (Boston, Massachusetts, EE. UU.) se calculó la media y desviación estándar del LCC de las tortugas con lesiones sugerentes de FP. También se calculó la prevalencia de tortugas con lesiones sugerentes de FP, la Tasa de Incidencia (TI) y la Incidencia Acumulada (IA) (VanderWaal *et al*., 2017; Thrusfield, 2018):

$$\textit{Prevalencia}\ (\%) = \frac{\textit{Número de inviduos con lesiones sugerentes de FP}}{\textit{Número total de individuos}}$$

$$\textit{Tasa de Incidencia}\ (\textit{TI}) = \frac{\textit{Número de casos nuevos}}{\textit{Suma de todos los periodos libres de la enfermedad durante el periodo definido del estudio}}$$

$$\textit{Incidencia Acumulada}\ (\textit{IA}) = \frac{\textit{Número de individuos con lesiones sugerentes de FP en un pediodo determinado}}{\textit{Número de individuos libres de lesiones sugerentes de FP en la población de estudio en un pediodo determinado}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la temporada 2022 en la playa El Suspiro se observaron un total de 419 tortugas golfinas anidadoras, de las cuales 8 presentaron lesiones proliferativas sugerentes de FP. Las tortugas lesionadas midieron en promedio 66.43 ± 3.13 cm de LCC. En total, presentaron 51 lesiones similares a FPs con grado 1, 2 y 3 de severidad. Los datos morfométricos de las tortugas, el kilómetro y la zona de playa donde se avistaron se muestran en la Tabla 1. Las características de las lesiones se describen en la Tabla 2. La prevalencia de tortugas con le-

Tabla 1. Datos generales de avistamiento y talla de las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) con lesiones proliferativas sugerentes de FP en playa El Suspiro, Baja California Sur, México.
Table 1. General data on sighting and size of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) with proliferative lesions suggestive of FP at El Suspiro beach, Baja California Sur, Mexico.

ID	Fecha (dd/mm/aaaa)	Kilómetro	Zona de playa	Largo curvo de caparazón (cm)
T1	03/07/2022	2	A	65
T2	15/07/2022	6	B	67
T3	18/07/2022	6	C	67.5
T4	20/07/2022	7	B	70
T5	26/08/2022	1	B	68
T6	11/10/2022	2	B	60
T7	11/10/2022	1	B	65
T8	12/12/2022	2	B	69

siones sugerentes de FP fue de 0.019 %, la Tasa de Incidencia (TI) fue de 0.069 y la Incidencia Acumulada (IA) fue de 0.019.

Las lesiones observadas coinciden anatómica y morfológicamente con los FPs previamente descritos a nivel mundial para diferentes especies de tortugas marinas (Jacobson *et al*., 1991; Aguirre *et al*., 1999), incluyendo tortugas golfinas anidadoras y juveniles en México (Reséndiz *et al*., 2015; 2019) y tortugas negras en Baja California Sur (Reséndiz *et al*., 2016; 2021). El diagnóstico morfológico indicó que las tortugas golfinas presentaron lesiones epiteliales proliferativas similares a FPs, grado 1 (n = 48), 2 (n = 2) y 3 (n = 1), sugerentes de FP.

Las lesiones con grado de severidad 1 no representan un riesgo para que las tortugas realicen sus funciones básicas (Work y Balazs, 1999; Yetsko *et al*., 2021), pero se consideran hallazgos importantes dado que la enfermedad puede

Tabla 2. Descripción macroscópica de las lesiones proliferativas de tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) anidadoras en playa El Suspiro, Baja California Sur, México.
Table 2. Macroscopic description of the proliferative lesions of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, Baja California Sur, Mexico.

ID	No. de lesiones	Área anatómica	Características macroscópicas	Grado de severidad	Figura
T1	4	Cuello, flanco derecho, dorsal, proximal al borde del caparazón.	Tres lesiones proliferativas semicirculares sésiles de 0.7, 0.8 y 1 cm de diámetro. Una lesión proliferativa semicircular, sésil de 3 cm de diámetro. Firmes al tacto con superficie rugosa, de colores gris, blanco, rosa y morado.	1 y 2	No
T2	8	Ambos flancos del cuello dorsal, proximal al borde del caparazón.	Flanco izquierdo: 4 lesiones proliferativas nodulares y semicirculares ligeramente alargadas, sésiles de 1.7, 2, 2 y 1.8 cm de diámetro. Firmes al tacto con superficie rugosa, de colores gris, rosa y negro. Flanco derecho: 4 lesiones proliferativas verrugosas y semicirculares ligeramente alargadas, sésiles de 2, 1.3, 2 y 1.5 cm de diámetro. Firmes al tacto con superficie rugosa, de colores gris y rosa pálido.	1	No
T3	13	Flanco derecho del cuello, ambos hombros y base de ambas aletas anteriores.	Flanco izquierdo: múltiples lesiones (7) sésiles, verrugosas, nodulares, proliferativas, individuales (3) y agrupadas (4), de 2, 1.4, 2.1, 3, 2.7, 1.2, 1.9 cm de diámetro, firmes al tacto, con superficie rugosa, de color rosa pálido. Flanco derecho: 6 lesiones sésiles verrugosas, nodulares, proliferativas, individuales (2) y agrupadas (4) de 2.4, 1.7, 2.3, 2, 2.8, 2.7 cm de diámetro, firmes al tacto, con superficie rugosa, de color rosa pálido y gris.	1	No
T4	14	Ambos hombros. Izquierdo: centro del hombro. Derecho: proximal al cuello y borde del caparazón.	Hombro flanco izquierdo: agrupación de 8 lesiones sésiles, verrugosas, nodulares y proliferativas de 0.7, 1.1, 1, 0.8, 0.8, 1.3, 1.5, 1.2 cm de diámetro, firmes al tacto, con superficie rugosa y de color gris y negro. Hombro flanco derecho: agrupación de 6 lesiones sésiles verrugosas nodulares proliferativas de 0.8, 1, 0.9, 1, 1.1, 1.3 cm de diámetro, firmes al tacto, con superficie rugosa y de color gris y negro.	1	No
T5	9	Aleta anterior izquierda base y dorsal.	Nueve lesiones sésiles, verrugosas, nodulares, proliferativas, individuales (4) y agrupadas (5) de 2.5, 1.5, 2.2, 4, 2.1, 3.2, 3.7, 3.9, 3.2, 3.5 cm de diámetro, firmes al tacto, con superficie rugosa, de color rosa pálido y gris.	1	1
T6	1	Debajo del tercer escudo marginal derecho, proximal al borde del caparazón.	Lesión proliferativa semicircular con morfología similar a una coliflor, de 8 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa, de un color rosa pálido/gris.	2	2a, 2b
T7	1	Hombro, flanco derecho, debajo del tercer escudo marginal derecho y proximal a la base de la aleta.	Lesión proliferativa, nodular, semicircular y sésil, de 12 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa/grisáceo.	3	3
T8	1	Base dorsal de la aleta izquierda, adyacente al hombro.	Lesión proliferativa, nodular, semicircular y sésil, de 1 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa pálido.	1	4

progresar y proliferar en otras regiones anatómicas. Cinco tortugas (T2, T3, T4, T5 y T8) presentaron lesiones nodulares y verrugosas con grado de severidad 1. Este tipo de lesiones indican que la FP estaba en progreso y podría desarrollarse rápidamente afectando a los organismos, que además pueden actuar como foco de contagio (Herbst *et al*., 1999; Work *et al*., 2020).

Dos tortugas (T1 y T6) presentaron lesiones con grado de severidad 2, las cuales indican que los individuos están experimentando un proceso intermedio (moderado) de infección de FP. Esto sugiere que si la FP continúa progresando puede resultar en un deterioro de las funciones mecánicas, locomotoras y fisiológicas de las tortugas (Herbst *et al*., 1999; Reséndiz *et al*., 2021; Yetsko *et al*., 2021). En esta etapa, dependiendo de la ubicación, el tamaño y grado de severidad, las lesiones de FP pueden tener consecuencias fatales, especialmente cuando aparecen tumores perioculares o corneales que obstruyen la visibilidad de las tortugas o cuando las masas obstruyen el canal orofaríngeo, alterando el desempeño y los comportamientos normales de la especie, como la respiración y la alimentación (Aguirre *et al*., 1999; Herbst *et al*., 1999; Reséndiz *et al*., 2016; Withmore *et al*., 2021; Yetsko *et al*., 2021). Las lesiones con grado de severidad 2 observadas en las tortugas de este estudio se encontraron en el flanco derecho del cuello y debajo del tercer escudo marginal derecho, proximal al borde del caparazón, por lo que, a pesar de no comprometer directamente sus funciones vitales, su crecimiento podría ocasionar problemas de nado o flotabilidad (Herbst *et al*., 1999).

Las lesiones con grado de severidad 3 generalmente se observan en tortugas debilitadas, varadas vivas y en casos graves moribundas, agonizantes o muertas. No obstante, también se puede presentar en organismos activos realizando sus funciones correspondientes a la etapa de su ciclo de vida (Reséndiz *et al*., 2015), como en la tortuga de este estudio (T7). A menudo las tortugas con FP grado 3 están emaciadas, debilitadas y/o caquécticas y presentan diversas anomalías en los analitos hematológicos, sugerentes de anemia por la cronicidad de la enfermedad y estimulación antigénica (Work *et al*., 2020). Las tortugas con FP grado 3 pueden mostrar problemas orgánicos que llevan a disfunciones sistémicas (Work *et al*., 2020), además de una serie de comorbilidades asociadas (p. ej. coinfecciones bacterianas, micóticas y/o parasitarias, íleo, problemas de flotabilidad, etc.) que pueden conducirlas a la muerte (Page-Karjian *et al*., 2020).

La mayor proporción de tortugas con lesiones se encontraron en el Km 2 y zona B de la playa. Hasta la fecha, no existe mucha información sobre la relación entre la distribución espacio temporal de tortugas anidadoras y la manifestación clínica de FP. Los estudios indican que FP se presenta con mayor frecuencia en tortugas juveniles en zonas de congregación para alimentarse o para aparearse (Aguirre y Lutz, 2004; Yetsko *et al*., 2021), y aunque existen reportes de golfinas hembras anidadoras con FP en el mundo y México (Aguirre *et al*., 1999; Reséndiz *et al*., 2015), este tema ha sido abordado con poca frecuencia. De cualquier manera, Page-Karjian *et al*. (2020) y Farrel *et al*. (2021) proponen que el virus (ChHV5) asociado a la FP en tortugas marinas puede estar presente en las playas de anidación, y que si bien las hembras anidadoras podrían adquirirlo por contacto directo con fluidos de organismos enfermos con organismos susceptibles, la manifestación clínica de la enfermedad no corresponde a la zona de anidación, si no que dependerá de otros factores detonantes, tales como el cansancio por la actividad física durante la migración, la condición sanitaria de las tortugas, la inmunosupresión de los organismos, o la contaminación, entre otros (Herbst *et al*., 1999), además de la presencia del ChHV5 (Ackermann *et al*., 2012).

Diversos autores han relacionado la presencia de tortugas enfermas de FP con la degradación ambiental de aguas costeras debido a impactos antropogénicos como las actividades urbanas, industriales y agrícolas (Aguirre *et al*., 1999; Whitmore *et al*., 2021). En otras partes del mundo, se reportan cada vez más tortugas marinas adultas y juveniles con FP en zonas de anidación y alimentación (Page-Karjian *et al*., 2020) lo que sugiere que la prevalencia de FP está incrementando a nivel mundial. En este estudio la prevalencia anual de tortugas con lesiones sugerentes de FP (0.019 %) fue baja con respecto a lugares como Florida, Hawai, Brasil y Puerto Rico en donde se han reportado prevalencias anuales del 3.2 %, 1.3 %, 2.95 % y 7.5 % (Patricio *et al*., 2011; Tagliolatto *et al*., 2016; Work *et al*., 2020; Yetsko *et al*., 2021) y donde la enfermedad representa una de las principales causas de muerte de tortugas marinas a nivel regional. En las zonas de alimentación de BCS la prevalencia de FP es de 0.2% (Reséndiz *et al*., 2021). A pesar de tener una prevalencia baja, en BCS y otras zonas de anidación y alimentación de tortugas marinas en México, los casos de FP son observados con mayor frecuencia, lo cual supone un factor de riesgo importante que puede tener consecuencias fatales para estos organismos (Page-Karjian *et al*., 2020). Es por ello que se está empezando a estudiar la enfermedad y reportar su prevalencia e incidencia en las diferentes especies de tortugas del país (Reséndiz *et al*., 2015; Suárez-Domínguez *et al*., 2020; Reséndiz *et al*., 2021). Por otra parte, la tasa de incidencia obtenida en este estudio representa el potencial instantáneo de cambio en el estado de salud por cada temporada de anidación. Este resultado indica que 0.069 tortugas podrían enfermarse diariamente durante la temporada de anidación en BCS. Comparado con Hawai (donde la FP es endémica) y Florida, donde se ha reportado una tasa de incidencia del 3.21 y 2.7 anual (Work *et al*., 2020; Yetsko *et al*., 2021), esto es, una tasa diaria de 0.009 y 0.007, la tasa de incidencia obtenida en este estudio sugiere un riesgo serio para las tortugas anidadoras de BCS. En este contexto, es importante resaltar que el número de individuos que pasan de un estado saludable a un estado de enfermedad durante cualquier periodo depende de tres factores: 1) del tamaño de la población, 2) de la amplitud del periodo de tiempo, y 3) del poder patógeno de la enfermedad sobre la población (VanderWaal *et al*., 2017; Thrusfield 2018). El cálculo de la Incidencia acumulada nos permitió inferir que en la temporada de anidación 2022 (7 meses), 0.019 tortugas



Figure 1. Nine sessile, verrucous, nodular, proliferative lesions, individual (four) and grouped (five). Firm to the touch, with a rough surface, pale pink and gray color, similar to FPs, suggestive of FP. Olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, BCS, Mexico.
Figura 1. Nueve lesiones sésiles, verrugosas, nodulares, proliferativas, individuales (cuatro) y agrupadas (cinco). Firmes al tacto, con superficie rugosa y de color rosa pálido y gris, similares a FPs, sugerentes de FP. Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) anidando en la playa El Suspiro, BCS, México



Figure 2a. Semicircular proliferative lesion with morphology similar to a cauliflower, 8 cm in diameter. Firm to the touch, with a rough surface and a pale pink/gray color, similar to FPs, suggestive of FP. Olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, BCS, Mexico.
Figura 2a. Lesión proliferativa semicircular con morfología similar a una coliflor, de 8 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa pálido/gris, similar a FPs, sugerente de FP. Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) anidando en la playa El Suspiro, BCS, México.



Figure 2b. Front shot. Semicircular proliferative lesion with morphology similar to a cauliflower, 8 cm in diameter. Firm to the touch, with a rough surface and a pale pink/gray color, similar to FPs, suggestive of FP. Olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, BCS, Mexico.
Figura 2b. Toma frontal. Lesión proliferativa semicircular con morfología similar a una coliflor, de 8 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa pálido/gris, similar a FPs, sugerente de FP. Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) anidando en la playa El Suspiro, BCS, México.



Figure 3. Proliferative, nodular, semicircular and sessile lesion, 12 cm in diameter. Firm to the touch, with a rough surface and a pink/grayish color, similar to FPs, suggestive of FP. Olive Ridley sea turtle (Lepidochelys olivacea) nesting at El Suspiro beach, BCS, Mexico.
Figura 3. Lesión proliferativa, nodular, semicircular y sésil, de 12 cm de diámetro. Firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa/grisáceo, similar a FPs, sugerente de FP. Tortuga golfina (Lepidochelys olivacea) anidando en la playa El Suspiro, BCS, México.



Figure 4. Proliferative, nodular, semicircular and sessile lesion, 1 cm in diameter, firm to the touch, with a rough, pale pink surface, similar to FPs, suggestive of FP. Olive Ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) nesting at El Suspiro beach, BCS, Mexico.
Figura 4. Lesión proliferativa, nodular, semicircular y sésil, de 1 cm de diámetro, firme al tacto, con superficie rugosa y de color rosa pálido, similar a FPs, sugerente de FP. Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) anidadora en playa El Suspiro, BCS, México.

tuvieron la probabilidad de enfermarse, presentar lesiones sugerentes de FP o de contraer FP, y que podría aumentar drásticamente cada año como se ha observado en Florida y Hawai (Work *et al*., 2020). Este cálculo es sumamente útil para comparar los diferentes riesgos a los que podrían enfrentarse los diferentes segmentos poblacionales de tortugas marinas en BCS.

CONCLUSIONES

La presencia de lesiones sugerentes de FP en tortugas golfinas anidadoras es un factor de riesgo adicional que puede contribuir al declive de las poblaciones de esta especie. La enfermedad se observa cada vez con mayor frecuencia en los sitios de agregación de tortugas marinas en el Pacífico mexicano, pudiendo propagarse rápidamente a otras zonas de anidación o alimentación.

Para comprender mejor los patrones de infección y transmisión de FP en esta región, proponemos un programa de monitoreo de salud continuo que incluya el registro de información de individuos enfermos en sitios de alimentación y anidación para evaluar la prevalencia e incidencia de la enfermedad a nivel regional.

Además, los estudios futuros deberán centrarse en caracterizar con más detalle los efectos citopáticos de las lesiones proliferativas y determinar la presencia de ChHV5, así como de otros patógenos. También recomendamos el estudio de los factores antropogénicos y ambientales que pueden contribuir a la propagación de la enfermedad, para que podamos comprender mejor la etiología, la patología y la epidemiología de la enfermedad en relación con las condiciones ecológicas. Esta información sustenta la importancia de incluir las evaluaciones de salud en los monitoreos de tortugas marinas en México, ayuda a fortalecer los planes de manejo y a desarrollar nuevas estrategias de conservación para estas especies y sus hábitats.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

Abreu-Grobois, A., y Plotkin, P. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group). 2008. *Lepidochelys olivacea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T11534A3292503. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11534A3292503.en. Accessed on 25 June 2023.

Ackermann, M., Koriabine, M., Hartmann-Fritsch, F., Jong, P.J., Lewis, T.D., Schetle N., Work T.M., Dagenais, J., Balazs, G.H., y Leong, J.A. 2012. The genome of Chelonid Herpesvirus 5 harbors atypical genes. *PLoS ONE 7*(10), e46623. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046623

Aguirre, A.A., y Lutz, P. 2004. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: Is Fibropapillomatosis an indicator? *EcoHealth* 1(3): 275-283. https://link.springer.com/article/10.1007/s10393-004-0097-3

Aguirre, A.A., Spraker, T.R., Chaves, A., Toit, L., Eure, W., y Balazs, G.H. 1999. Pathology of fibropapillomatosis in olive ridley turtles nesting in Costa Rica. *Journal of Aquatic Animal Health* 11(3): 283-289. https://doi.org/10.1577/1548-8667(1999)011<0283:POFIOR>2.0.CO;2

Barragan, A.R., y Sarti, M.L. 1994. A possible case of fibropapilloma in Kemp's ridley turtle *(Lepidochelys kempii)*. Marine Turtle Newsletter 67(1): 28. http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn67/mtn67p27.shtml

Bolten, A. 1999. Techniques for measuring sea turtles. In: Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles, p. 126. Eckert, K., Bjorndal, K., Abreu-Grobois, A., Donnelly, M., Eds., Washington, DC, USA. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication no. 4. https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/1999-076.pdf

Cáceres-Farias, L., Reséndiz, E., Espinoza, J., Fernández-Sanz, H., y Alfaro-Núñez, A. 2022. Threats and vulnerabilities for the globally distributed olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtle: A historical and current status evaluation. *Animals* 12, 1837. https://doi.org/10.3390/ ani12141837.

Farrell, J.A., Yetsko, K., Whitmore, L., Whilde, J., Eastman, C.B., Ramia, D.R., Thomas, R., Linser, P., Creer, S., Burkhalter, B., Schniltzer, C. y Duffy D.J. 2021. Environmental DNA monitoring of oncogenic viral shedding and genomic profiling of sea turtle fibropapillomatosis reveals unusual viral dynamics. *Communications biology* 4(1), 565. 10.1038/s42003-021-02085-2

Gámez, V.S., García, M.J.L., Osorio, S.D., Vázquez, G.J.L., y Constantino, F. 2009. Patología de las tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*) que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México. *Veterinaria México* 40(1): 69-78. https://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v40n1/v40n1a7.pdf

Herbst, L.H., Jacobson, E.R., Klein, P.A., Balazs, G.H., Moretti, R., Brown, T., y Sundberg J. 1999. Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology* 36(6): 551-564. 10.1354/vp.36-6-551

Huerta, P., Pineda, H., Aguirre, A., Spraker, T., Sarti, L., y Barragan, A. 2002. First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). In proceedings of the 20th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, p. 193. National Oceanic and Atmospheric Administration technical memorandum NMFS-SEFSC-477. Washington, DC: United States Department of Commerce. https://www.researchgate.net/publication/313390181_First_confirmed_case_of_fibropapilloma_in_a_leatherback_turtle_Dermochelys_coriacea

IUCN. 2008. IUCN Red List of Threatened Species. http://www.iucnredlist.org. Fecha de consulta 20 de Junio de 2023.

Jacobson, E.R., Buergelt, C., Williams, B., y Harris, R.K. 1991. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12(1): 1-6. https://www.int-res.com/articles/dao/12/d012p001.pdf

Maldonado-Gasca, A., y Zapata-Rosales, M.T. 2007. Primeros registros de tortugas blancas *Chelonia mydas* con fibropapilomas en Yucatán, México. CICIMAR *Oceánides* 22(1-2): 29-33. https://doi.org/10.37543/oceanides.v22i1-2.35

Mashkour, N., Jones, K., Wirth, W., Burgess, G., y Ariel, E. 2021. The concurrent detection of Chelonid alphaherpesvirus 5 and *Chelonia mydas* Papillomavirus 1 in tumoured and on-tumoured green turtles. *Animals* 11(3): 697. https://doi.org/10.3390/ani11030697

Mejía-Radillo, R.Y., Zavala-Norzagaray, A.A., Chávez-Medina, J.A., Aguirre, A.A., y Escobedo-Bonilla, C.M. 2019. Presence of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) in sea turtles in northern Sinaloa, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 132(2): 99-108. 10.3354/dao03313

Page-Karjian, A., Chabot, R., Stacy, N.I., Morgan, A.S., Valverde, R.A., Stewart, S., Coppenrath, C., Manire, C.A., Herbst, L.H., Gregory, C.R., Ritchie, B., y Perrault, J. 2020. Comprehensive health assessment of green turtles *Chelonia mydas* nesting in southeastern Florida, USA. *Endangered Species Research* 42, 21-35. https://doi.org/10.3354/esr01036

Patricio, A.R., Velez-Zuazo, X., Diez, C.E., Van Dam, R., y Sabat, A.M. 2011. Survival probability of immature green turtles in two foraging grounds at Culebra, Puerto Rico. *Marine Ecology Progress Series* 440, 217-227. https://doi.org/10.3354/meps09337

Reséndiz, E., Cedillo-Peláez, C., Harfush-Meléndez, M., Salas-Garrido, C.G., y Constantino-Casas, F. 2015. Caracterización macroscópica, microscópica y ultraestructural de Fibropapilomas de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la playa "Escobilla" Oaxaca. *Ciencia y mar* 24(56): 3-18. https://biblat.unam.mx/hevila/Cienciaymar/2015/no56/1.pdf

Reséndiz, E., Fernández-Sanz, H., Domínguez-Contreras, J.F., Ramos-Díaz, A.H., Mancini, A., Zavala-Norzagaray, A.A., y Agiurre, A.A. 2021. Molecular characterization of Chelonid alphaherpesvirus 5 in a black turtle (*Chelonia mydas*) fibropapilloma from Baja California Sur, Mexico. *Animals* 11(1): 105. 10.3390/ani11010105

Reséndiz, E., Fernández-Sanz, H., Torres, D.S., Vega-Bravo, J.A., y Lara M. 2019. Gross examination and histopathology of fibropapillomas in *Chelonia mydas* and *Lepidochelys olivacea* from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Histology and Histopathology* 2019; 6:1. http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-6-1.

Reséndiz, E., Flores-Ramírez, S., Koch, V., y Cordero-Tapia, A. 2016. First record of fibropapillomatosis in a green turtle *Chelonia mydas* from the Baja California Peninsula. *Journal of Aquatic Animals Health* 28(4): 252-257. 10.1080/08997659.2016.1223207

SEMARNAT. 2018. Programa de acción para la conservación de la especie tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), SEMARNAT/CONANP, México (Año de edición 2018). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/443997/PACE_Tortuga_Golfina.pdf

Smith, G.M., y Coates, C.W. 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica* 23**:** 93-98.https://doi.org/10.5962/p.203654

Suárez-Domínguez, E.A., Martínez-Serrano, I., Righini, N., Chamlaty-Fayad, Y.E., Bello-Sánchez, E.A., y Ramos-Díaz, A.H. 2020. Fibropapillomatosis in free-ranging green sea turtles (*Chelonia mydas*) off the central coast of Veracruz, Mexico. *Ciencias Marinas* 46(2):133-143. https://doi.org/10.7773/cm.v46i2.3043

Tagliolatto, A.B., Guimarães, S.M., Lobo-Hajdu, G., y Monteiro-Neto, C. 2016. Characterization of fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* (Cheloniidae) captured in a foraging area in southeastern Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms* 121(3), 233-240. 10.3354/dao03020

Thrusfield, M. (2018) Veterinary epidemiology. John Wiley & Sons.

VanderWaal, K., Morrison, R.B., Neuhauser, C., Vilalta, C. y Perez, A.M. 2017. Translating big data into smart data for veterinary epidemiology. *Frontiers in Veterinary Sciences* 4:110. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00110

Whitmore, L., Yetsko, K., Farrell, J.A., Page-Karjian, A., Daniel, W., Shaver, D.J., Frandsen, H., Shelby-Walker, J., Crowder, W., Bovery, C., Rollinson, D., Burkhalter, B., Ryan, E., y Duffy, D. 2021. Evolutionary genomic comparisons of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) from fibropapillomatosis-afflicted green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. *Animals* 11(9): 2489. 10.3390/ani11092489

Work, T.M., y Balazs, G.H. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases* 35(4): 804-807. 10.7589/0090-3558-35.4.804

Work, T.M., Dagenais, J., Willimann, A., Balazs, G., Mansfield, K., y Ackermann, M. 2020. Differences in antibody responses against Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV5) suggest differences in virus biology in ChHV5-seropositive green turtles from Hawaii and ChHV5-seropositive green turtles from Florida. *Journal of Virology* 94(4), e01658-19. 10.1128/JVI.01658-19

Yetsko. K., Farrell, J.A., Blackburn, N.B., Whitmore, L., Stammnitz, M.R., Whilde, J., Eastman, C., Rollinson, D., Thomas, R., Krstic, A., Linser, P., Creer, S., Carvahlo, G., Devlin, M., Nahvi, N., Leandro, A.C., deMar, T., Burkhalter, B., Murchison, M., Schinzler, C., y Duffy, D. 2021. Molecular characterization of a marine turtle tumor epizootic, profiling external, internal and postsurgical regrowth tumors. *Communications biology* 4(1): 1-16. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01656-7

Zavaleta-Lizárraga, L., y Morales-Mávil, JE. 2013. Nest site selection by the green turtle (*Chelonia mydas*) in a beach of the north of Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84(3): 927-937. 10.7550/rmb.31913

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Orujo de Uva y su efecto en el desempeño productivo y microbiota intestinal de cerdos finalizadores

Grape pomace effect on growth performance and intestinal microbiota of finishing pigs

Kevin Alberto Avilés-Peterson[1], Maricela Montalvo-Corral[1], Humberto González-Ríos[1], Héctor Parra-Sánchez[1], Miguel Ángel Barrera-Silva[2] y Araceli Pinelli-Saavedra[1]* ✉

[1] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, México 83304.

[2] Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Carretera a Bahía de Kino km. 21. Hermosillo, Sonora 83000, México.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de orujo de uva (OU) sobre la microbiota intestinal (MI) y desempeño productivo de cerdos finalizadores. Se utilizaron 20 cerdos finalizadores machos (Duroc x Yorkshire, peso vivo inicial de 80 kg), alojados individualmente en corraletas provistas de bebedero y comedero. Se asignaron aleatoriamente a uno de dos tratamientos (n = 10): Testigo (dieta comercial, (DB) sin OU) y OU (DB + 25 g OU/ kg). La prueba de alimentación fue de 31 d. El comportamiento productivo se evaluó mediante la ganancia de peso diaria, el consumo de alimento diario y la conversión del alimento. Los cambios en la composición y abundancia en MI se evaluaron mediante qPCR en muestras de heces. La suplementación con OU incrementó significativamente ($p < 0.05$) el consumo de alimento y la ganancia de peso, pero no mostró efecto en la conversión alimenticia ($p > 0.05$). En la MI, la suplementación con OU no tuvo efecto ($p > 0.05$) en la abundancia de los géneros *Lactobacillus* spp, *Faecalibacterium praustnitzi* y *E. coli*, pero *Campylobacter* spp. incrementó ($p < 0.05$). Si bien, no se observó el comportamiento esperado en MI, su efecto positivo en la ganancia de peso podría permitir acortar los tiempos de producción.

Palabras clave: orujo de uva, microbiota intestinal, desempeño productivo, cerdos.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of grape pomace (GP) supplementation on the intestinal microbiota and the productive performance of finishing pigs. Twenty male finishing pigs (Duroc x Yorkshire, initial live weight of 80 kg) were used, housed individually in pens provided with drinkers and feeders. The feed experimental phase lasted 31 d, and ten animals were randomly assigned to each treatment: Control (commercial diet (BD) without GP) and GP (BD + 25 g GP/kg). Productive performance was evaluated by daily weight gain, daily feed intake and feed conversion. Changes in the composition and abundance of the microbiota were evaluated by qPCR on stool samples. GP supplementation significantly ($p < 0.05$) increased feed intake and weight gain but showed no effect on feed conversion ($p > 0.05$). Regarding the microbiota, supplementation had no effect ($p > 0.05$) on the genera *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium praustnitzi* nor *E. coli*, but *Campylobacter* spp. increased ($p < 0.05$). The results on intestinal microbiota were not expected; however, a positive effect on weight gain was found, allowing for shortening production times.

Keywords: grape pomace, gut microbiota, productive performance, pigs.

INTRODUCCIÓN

La salud y el bienestar de los cerdos es un factor a tener en cuenta a lo largo de todo el proceso productivo, donde la microbiota intestinal (MI) juega un papel fundamental en su salud. Después del destete y hasta alcanzar el peso al mercado, la composición y funcionalidad de la MI experimentan constantes cambios, jugando un papel fundamental en la respuesta al estrés e impactando en el crecimiento y correcto desarrollo del animal (Kim y Isaacson, 2015; Guevarra *et al*., 2018; Pluske *et al*., 2019*a*). Los cambios bruscos de dieta o de determinados ingredientes pueden provocar alteraciones en la MI, lo que obliga a un mayor uso de antibióticos. El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en cerdos es común durante sus primeras etapas de vida para obtener mayores rendimientos productivos. Sin embargo, se ha señalado que su uso promueve disbiosis a largo plazo en los animales y genera resistencia en algunas bacterias patógenas (*E. coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium*) lo que representa pérdidas económicas significativas y un grave problema de salud pública (Looft *et al*., 2012; World Health Organization 2012; Carlson y Fangman, 2018). Por lo que, es fundamental seguir mejorando la producción porcina y reducir el uso de los antibióticos con el fin de incrementar la protección del consumidor. Además de los problemas asociados a los antibióticos, los países miembros de la Comunidad Económica Europea y Japón ya cuentan con algunas normativas que prohíben la presencia de residuos de antibióticos en la carne, por lo que muchos antibióticos ya están prohibidos en estos países (Codex Alimentarius, 1997; CORDIS, 2022). Por ello, es necesario encontrar nuevas alternativas que permitan man-

*Autor para correspondencia: Araceli Pinelli-Saavedra
Correo-e: pinelli@ciad.mx
Recibido: 16 de octubre de 2023
Aceptado: 10 de abril de 2024
Publicado: 3 de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2177

tener la salud intestinal de los animales desde el nacimiento hasta la etapa de finalización. El uso de algunos aditivos con efecto prebiótico y que además puede ser la solución. El orujo de uva (OU) es un producto de desecho de la industria vitivinícola, constituido principalmente por piel, pulpa, palillos y semillas de la uva, y es rico en polifenoles, que le confieren propiedades beneficiosas para la salud humana y animal. (Chedea *et al*., 2018; Balbinoti *et al*., 2020). Debido a su contenido en compuestos fenólicos, varios estudios han evaluado las propiedades antioxidantes, antibióticas, antifúngicas y antiinflamatorias del OU. Se ha observado que promueve la proliferación de bacterias beneficiosas (*Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium praustnitzi* y *Bifidobacterium* spp.) e inhibe otras que son patógenas, impactando positivamente en el crecimiento y algunos parámetros indicadores de la salud animal (Kafantaris *et al*., 2018; Chedea *et al*., 2018; Wang *et al*., 2020). Sin embargo, existen pocos estudios en cerdos, especialmente su efecto prebiótico en la etapa de finalización. De ahí que, este trabajo evaluó el efecto de la adición del orujo de uva sobre la microbiota intestinal (*Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium praustnitzi*, *E. coli* y *Campylobacter* spp.) y el desempeño productivo de cerdos finalizadores.

MATERIALES Y METODOS

Todos los procedimientos relacionados con el manejo y cuidado de los animales se realizaron dentro de los lineamientos oficiales mexicanos aprobados para el cuidado de animales según la NOM-EM-051-ZOO-1995.

Animales y dietas

El trabajo experimental se realizó en la unidad de producción porcina del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, sede Hermosillo (D.A.G UNISON) en los meses de mayo y junio del 2022. Las muestras recolectadas se analizaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Se utilizaron un total de 20 cerdos macho Landrace x Yorkshire finalizadores, alojados individualmente en corrales provistos de bebedero y comedero. La fase de suplementación se realizó durante los 31 días previos al sacrificio. Diez corrales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: Grupo Testigo (animales que reciben dieta basal, DB sin OU) y grupo OU (animales recibiendo DB + 25 g OU/kg de alimento). La dieta basal fue adquirida de la empresa Kowi® que corresponde a dieta para cerdos finalizadores Fase 7 y cumple con las recomendaciones de la NRC (2012); la composición del alimento se describe en la Tabla 1. El OU de variedad Tempranillo, 48 h después del prensado fue suministrado por una empresa productora de vino industrial en Ensenada, Baja California, se secó en un horno de convección ENVIRO-PAK, modelo Micro-Pak, serie MP500 (Clackamas, OR, USA) a 60°C durante 6 h y se obtuvo un producto con una humedad menor de 10%. El OU seco se molió a un tamaño de partícula de 1 mm en un equipo Pulvex 200 (Cd. México, Mex) para obtener la harina de OU y se empacó, bolsas de plástico selladas al vacío, se protegió de la luz y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Se adicionó en forma harina (Kumanda *et al*., 2019). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

Tabla 1. Composición y análisis proximal del alimento para cerdos finalizadores.
Table 1. Composition and proximate analysis of the diet for finishing pig**.**

Ingredientes	(kg/ton)
Trigo	762
Pasta de soya	170
Aceite	44
MIC*	24
Análisis proximal (%)	
Proteína	14.0
Humedad	11.9
Grasa	7.0
Fibra	2.0
ELN**	56.1

*MIC. Contiene vitaminas, minerales y aminoácidos que cubren los requerimientos de los cerdos en fase finalización de acuerdo con la NRC (2012).
**ELN: Extracto libre de nitrógeno: se consideran Carbohidratos, se obtuvo por diferencia.

La determinación de la composición proximal de la harina de OU se realizó en un laboratorio de CIAD, A.C., por los métodos oficiales de la AOAC (2005), en cuanto a la fibra total, fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA), fueron determinadas por un laboratorio externo AGROLAB MEXICO (Durango, Dgo, México), mientras que para la extracción de sus compuestos fenólicos se empleó la metodología descrita por Casagrande *et al*., (2019). Para la determinación de fenoles totales y flavonoides se llevaron a cabo los métodos de Folin–Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) y Park *et al*., (1998) respectivamente. La capacidad antioxidante total de OU se midió usando la metodología descrita por Echegaray *et al*., (2021) para las técnicas de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), potencial reductor férrico (FRAP) y el TEAC equivalente en trolox por la técnica de ácido 2, 2' Azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico (ABTS).

Recolección de muestra de heces

Se recolectaron muestras de heces previa a la suplementación y a los 31 días posteriores a la suplementación, para evaluar el comportamiento de la microbiota. Se recolectaron muestras de cuatro animales por tratamiento en cada tiempo mencionado. Para su colecta, se realizó un estímulo del esfínter anal a los animales y las heces se colocaron directamente en un frasco estéril para muestras clínicas. Las muestras fueron etiquetadas y colocadas en una hielera para su transporte a los laboratorios de CIAD. Fueron almacenadas a 4 °C y procesadas dentro de las primeras 24 h.

Análisis de Microbiota

Las extracciones de ADN se llevaron a cabo utilizando el QIAmp Fast DNA Stool Minikit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se identificaron las bacterias de

interés en este estudio, empleando secuencias de iniciadores publicadas (Tabla 2). Para la detección de los géneros *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Campylobacter*, *E. coli* y procariota se utilizó HotStart-IT® SYBR® Green qPCR Master Mix Kit (Affymetrix; Lot. 4274886; Santa Clara, CA). La amplificación se realizó en el termociclador StepOne TM (Applied BioSystems).

Para la cuantificación de los géneros bacterianos seleccionados, se determinó la abundancia relativa en función de la amplificación relativa. Para el análisis se utilizó la relación entre niveles de expresión del gen de interés con respecto al de un gen de referencia, para obtener los valores de ΔCt (Ct gen interés – Ct gen de referencia). En donde Ct es el ciclo en el que se detecta la fluorescencia acumulada por encima del nivel umbral, lo que es inversamente proporcional a la cantidad de templado (ADN) inicial en la muestra.

Se emplearon los valores de Ct de la detección del gen 16S de procariotas como gen de referencia y el valor de Ct del género específico evaluado para obtener el valor de la amplificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores de abundancia relativa se obtuvieron con la siguiente ecuación: $2^{(-\Delta Ct)}$.

Comportamiento productivo

Todos los animales se pesaron individualmente al inicio y al final del experimento, utilizando una balanza electrónica DIABATEC Modelo Lumina (Guadalajara, Mex.). La ganancia diaria promedio (GDP) se estimó por la diferencia entre el peso inicial y final dividido entre los 31 d del período de alimentación. El consumo de alimento se evaluó diariamente a partir de la diferencia de peso entre el alimento ofrecido y el alimento rechazado, se utilizó una báscula DIABATEC modelo Básica (Guadalajara, Mex.). La tasa de conversión alimenticia (CA) por corral/tratamiento se basó en el consumo promedio de alimento y GDP. Los animales también se observaron diariamente durante todo el estudio y no se observaron efectos adversos a la suplementación del OU.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se verificó normalidad de los datos por la prueba de Kolmogorov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene. Para los resultados de capacidad antioxidante y composición proximal del OU, se realizó estadística descriptiva. Todos los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar. Para las variables de desempeño productivo, el análisis de varianza incluyó los tratamientos como efecto fijo y el peso inicial individual del animal como covariable. Se consideró a cada animal como la unidad experimental. Los datos de abundancia de la MI se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, ajustando como factor principal a los tratamientos y como covariable a los valores iniciales de la MI. Los valores de abundancia relativa de la MI al final de la suplementación, fueron transformados a Log10 para ajustarlos a la normalidad. La significación se estimó a un nivel de probabilidad de 0.05 en el tipo de error I. Todos los datos se procesaron mediante el paquete estadístico NCSS (Hintze, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis proximal, contenido de fenoles y capacidad antioxidante del OU se reporta en la Tabla 3. El orujo de uva utilizado en este estudio presentó un contenido de fibra cruda del 24.12 %, de los cuales la FDA y la FDN representan un 40.48% y 28.43 %, de ese porcentaje respectivamente. Además, su contenido de fenoles totales fue de 20.81 ± 0.7 mg EAG/g, mientras que de flavonoides un contenido de 11.3 ± 2.12 mg EC/g. Respecto a su capacidad antioxidante por las técnicas de FRAP, TEAC y DPPH, esta fue de 104.74 ± 8.8, 139.4 ± 3.57, 114.82 ± 2.26 µM ET/g, respectivamente. Estudios como el de Taranu *et al*. (2020), en donde suplementaron 8 % de harina de semilla de uva en la dieta de cerdos destetados, reportaron un contenido de fenoles totales de 795 mg EAG/L (0.795 mg EAG/g) en la harina. Si bien, su contenido de fenoles es mucho menor a lo reportado en este estudio, observaron una mejora en el estrés oxidativo. Mientras que Taranu *et al*. (2018), suplementaron durante 24 d a cerdos finalizadores con un 5 % de harina de semilla de uva con un contenido de fenoles totales de 53.55 mg EAG/g, predominando flavonoles y antocianinas, y una actividad antioxidante de 32.70 µM ET/g mediante DPPH. Además, estos autores reportaron que la harina de semilla de uva presentó por cada 100 g, un contenido de proteína de 10.61 g y 40. 66 g de fibra cruda, lo que indica un menor contenido de proteína y mayor contenido de fibra, en comparación al orujo utilizado en el presente

Tabla 2. Secuencias de iniciadores utilizados en qPCR para el análisis de abundancia relativa de géneros y especies de la microbiota intestinal.
Tabla 2. Sequences of primers used in qPCR for gut microbiota analysis.

Especie	Primer	Secuencia 5´- 3´	Referencia
Procariotas	F_Bact1369 R_Prok1492	CGGTGAATA CGT TCC CGG TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	Furet *et al*., 2009
***Lactobacillus* (391bp)**	F_Lacto 05 R_Lacto 04	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA	Furet *et al*., 2009
***Faecalibacterium* (*F. prausnitzii*)**	FPR-1F FPR-2R	AGATGGCCTCGCGTCCGA CCGAAGACCTTCTTCCTCC	Halmos *et al*., 2015
Campylobacter	Campi_F Campi_R	GGATGACACTTTTCGGAG AATTCCATCTGCCTCTCC	Rinttilä *et al*., 2004
E. coli	E.coli F E.coli R	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA CGG GTA ACG TCA ATG AGC AA	Huijsdens *et al*., 2002

Tabla 3. Análisis proximal, contenido de fenoles y capacidad antioxidante del orujo de uva.
Table 3. Proximate analysis, phenols, and antioxidant capacity of grape pomace.

Análisis proximal (%)*	Orujo de Uva
Proteína	13.42 ± 0.02
Humedad	7.88 ± 0.043
Grasa	7.61 ± 0.15
Fibra Cruda**	24.12
Fibra en Detergente Acido (FDA)	40.48
Fibra en Detergente Neutral (FDN)	28.43
Fibra en Detergente Neutral, libre de cenizas	31.09
Ceniza	6.98
FRAP µM ET/g	104.74 ± 8.8
TEAC µM ET/g	139.40 ± 3.57
DPPH µM ET/g	114.82 ± 2.26
FT mg EAG/g	20.81 ± 0.7
Flavonoides mg EC/g	11.3 ± 2.12

* Official Methods of Analysis of Chemists, AOAC International, Ed 18th, 2005.
** AGROLAB México S.A. de C.V.
ET= Equivalentes de trolox, EAG: Equivalentes de ácido gálico, EC: Equivalentes de catequina.

estudio. Por otro lado, Kafantaris *et al*. (2018), suplementaron un ensilado con 9 % de orujo de uva en la dieta de lechones destetados a los 20 d de edad. Según su estudio, la dieta con orujo de uva mostró una actividad antioxidante de 9.8 mg/mL medida por DPPH, y un contenido de fenoles totales de 0.82 mg EAG/g.

Como se puede observar, el contenido de fenoles totales, la capacidad antioxidante y algunos aspectos de la composición proximal como el contenido de fibra en el orujo de uva, pueden variar si éste es adicionado como harina, ensilado o bien, si está hecho a partir de varios componentes de la uva o solo alguno de ellos, como la semilla, ya que de esto depende su efecto en la MI y su efecto sobre los parámetros productivos.

Comportamiento productivo

Los valores medios de cada tratamiento referentes al peso inicial, peso final, ganancia de peso diaria, ganancia de peso, consumo de alimento diario y conversión alimenticia durante el periodo experimental de los 31 días se presentan en la Tabla 4. Se observó que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el peso inicial (d-0) entre el grupo testigo (80.08 ± 2.70 kg) y el grupo OU (80.04 ± 2.70 kg). Pasados los 31 días se presentó un peso final mayor ($p < 0.05$) en los animales suplementados con el OU, reportándose un peso medio de 119.55 ± 2.4 kg, con relación al grupo testigo, donde se presentó un peso de 115.37 ± 2.60 kg. La suplementación con OU mostró un efecto positivo en la GPD 1.27 ± 0.03 y en la ganancia total de 39.50 ± 1.13 kg, ambas significativamente mayores ($p < 0.05$) en comparación al grupo testigo1.15± 0.03 y 35.93 ± 1.93, respectivamente. Por otro lado, el consumo de alimento diario también fue mayor ($p < 0.05$) en los animales suplementados con OU, con un consumo medio de 3.41 ± 0.07 kg con respecto testigo el cual mostró un

Tabla 4. Desempeño productivo de los cerdos finalizadores suplementados con orujo de uva (OU) y dieta testigo durante 31 días.
Table 4. Productive performances of finishing pigs supplemented with grape pomace (GP) and control diet for 31 days.

	Testigo	OU
Peso inicial, kg	80.08^{a} ±2.70	80.04^{a} ± 2.70
Peso final, kg	115.37^{a} ±2.60	119.55^{b} ± 2.4
Ganancia de peso diaria promedio	1.15^{a} ±0.03	1.27^{a} ±.0.03
Ganancia de peso 31 d, kg	35.93^{a} ±1.19	39.50^{b} ±1.13
Consumo de alimento, kg	3.10^{a}± 0.07	3.41^{b} ± 0.07
Conversion de alimento, kg	2.68^{a} ± 0.09	2.70^{a} ± 0.08

n = 10 cerdos por tratamiento; ^{ab} valores promedios con diferente superíndice dentro del renglón son diferentes ($p < 0.05$). ± error estándar.

consumo de 3.10 ± 0.07 kg. Sin embargo, la suplementación no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la conversión alimenticia, aunque benefició la ganancia de peso, también incrementó el consumo de alimento. Este aumento en el consumo de alimento indica el potencial que tiene el OU para mejorar la palatabilidad del alimento, tal como ha sido documentado en otras especies por investigaciones previas (Tayengwa *et al*., 2020; Tayengwa *et al*., 2021). Al evaluar las diferencias en términos de costos de producción, se observa que, a pesar del aumento en el consumo de alimento, éste no tuvo un gran impacto, ya que el incremento en la ganancia de peso fue del 10% en comparación con el grupo de control. Esto podría reducir los tiempos de producción en la granja, ya que, por ejemplo, para alcanzar un peso final de 115 kg para el sacrificio, se requieren 27 d con el grupo con OU y 30 d con el grupo de testigo. Esto se calcula considerando la diferencia entre el peso objetivo y el peso inicial dividido por la ganancia de peso diaria, lo que resulta en una diferencia de tres días menos para el grupo OU.

Si bien, son escasos los estudios que evalúan el efecto del OU en el comportamiento productivo de cerdos en la etapa de finalización, existen estudios donde reportan su efecto en etapas de producción más tempranas, sin embargo, resultan contrastantes entre ellos y con nuestros resultados. Estudios como el de Chedea *et al*. (2018), en donde suplementaron con 5 % de OU a lechones recién destetados durante 36 d, reportan un incremento en el consumo de alimento diario promedio, pero no un efecto en la ganancia de peso. Mientras que estudios como el de Kafantaris *et al*. (2018), en donde evaluaron la suplementación de un ensilaje con 9 % de OU durante 30 días, como aditivo alimentario en la dieta de lechones destetados con 20 días de edad, sí observaron un incremento del 23.65 % en la GDP a lo largo de todo el periodo experimental con relación al testigo. Dicho porcentaje, representó una diferencia de 0.044 kg/d, ya que se observó una GDP de 0.186 ± 0.01 kg/d en el control y 0.230 ± 0.01 kg/d en el grupo suplementado con OU. Además de observar que, con la suplementación el consumo de alimento promedio fue significativamente mayor de los 35 a 50 d de edad, mientras que la conversión alimenticia fue significativamente más baja de los 20 a 35 d de edad. En cerdos lechones el OU presentó una GDP mayor, 0.044 kg/d más con relación al control; mientras que, en el presente trabajo en cerdos finalizadores, dicha diferencia fue de 0.27 kg/d.

Por otro lado, los estudios de Hao *et al*. (2015) y Wang *et al*. (2020), en donde suplementaron con procianidinas de semilla de uva (en concentraciones de 50, 100, 150 mg/kg) y con 5 % de OU, respectivamente, durante 4 semanas a cerdos destetados, no reportaron un efecto en el comportamiento productivo. Así también, en el estudio de Sehm *et al*. (2011), en donde suplementaron durante 19 días a 36 lechones de 31 d de edad con 3.5 % de OU, no se reportaron cambios significativos en el consumo de alimento y la GDP con relación al testigo.

Si bien, en el presente estudio, la inclusión de 25 g de OU/kg no presentó un aumento significativo en la conversión alimenticia de cerdos finalizadores respecto al control, si mostró un efecto en el consumo de alimento y en la ganancia de peso. Se considera que la alimentación puede representar hasta el 70% de los costos totales de producción (Pomar y Remus, 2019), la utilización de OU puede mitigar dichos costos al acortar los tiempos de producción, permitiendo que el animal alcance el peso de mercado antes de tiempo y reduciendo así también los costos de su mantenimiento.

Microbiota Intestinal

El comportamiento que mostró la abundancia relativa de los géneros de interés al transcurrir el periodo experimental independientemente del tratamiento se observa en la Figura 1. Al concluir la suplementación, la abundancia relativa de *Lactobacillus* y *E. coli* no mostró un cambio ($p > 0.05$) en comparación con su abundancia previa a la suplementación, en ambos tratamientos (testigo y OU). En cuanto a *Faecalibacterium*, disminuyó ($p < 0.05$) en ambos tratamientos al transcurrir el periodo experimental. Mientras que *Campylobacter* disminuyó ($p<0.05$) en el grupo testigo y se mantuvo sin diferencias ($p > 0.05$) en el grupo suplementado con OU. Luo *et al*. (2022), reportaron que los géneros *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* son de los más abundantes durante el crecimiento del cerdo. Sin embargo, *Lactobacillus* es de los más abundantes y mayormente asociado a la etapa de lactancia, mientras que *Faecalibacterium* es de las predominantes en la etapa de crecimiento, pero no en la de finalización, lo que sugiere que estos dos géneros disminuyen conforme el animal se acerca a la finalización. Mientras que el género *Escherichia*, se reporta presente en todas las etapas de vida, principalmente en la lactancia. Lo anterior, podría explicar el comportamiento de estos géneros a través del tiempo independientemente de la suplementación con OU en el presente trabajo. En cuanto a *Campylobacter* y *E. coli*, se han observado en diversas etapas de vida del cerdo, principalmente en la lactancia, durante la transición hacia un alimento sólido y durante el crecimiento, siendo *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* las de mayor prevalencia (Young *et al*., 2000; Alter *et al*., 2005; De Rodas *et al*., 2018). Aunque, este género puede estar presente en diferentes etapas de vida, se ha observado que su abundancia relativa incrementa en cerdos desafiados por *E. coli* (Kaevska *et al*., 2016).

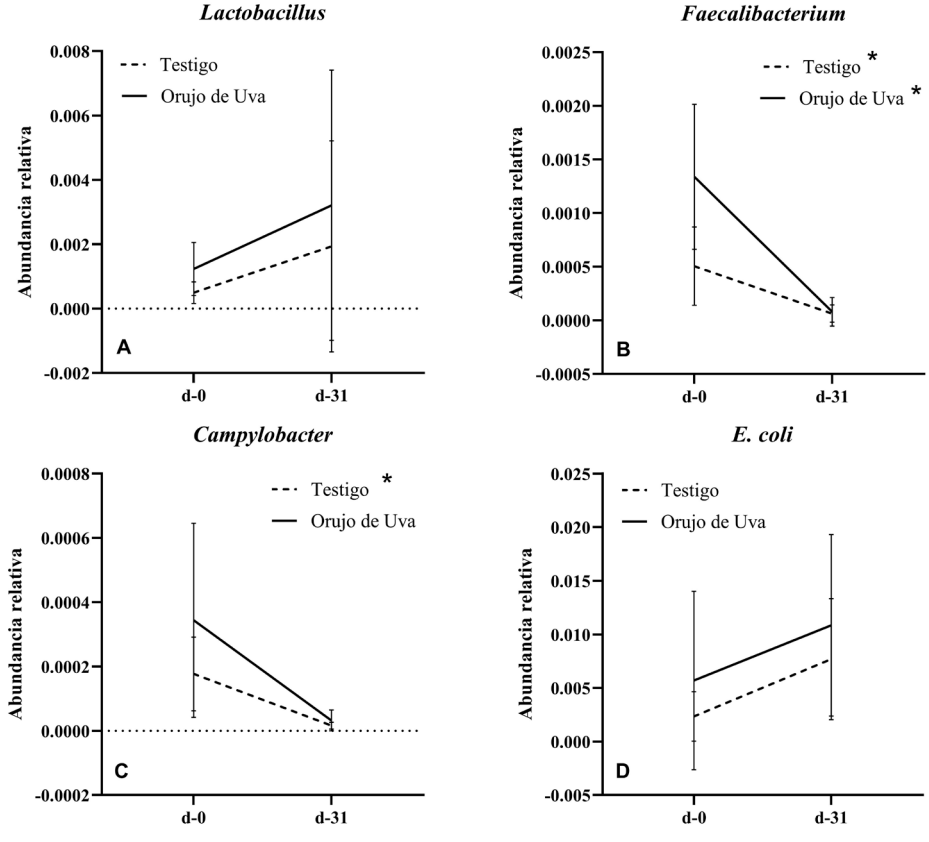


Figura 1. Comportamiento de la abundancia relativa de los géneros bacterianos de interés del día 0 al día 31. *Se comparó estadísticamente la abundancia relativa del día 0 con la del día 31, para cada género de interés en ambos tratamientos, considerando una $p < 0.05$ como significativa.

Figure 1. Abundant relative of the bacterial genera at day 0 and 31. *The relative abundance at day 0 was statistically different compared with that of day 31 for each genus of interest in both treatments, considering $p < 0.05$ as significant.

En cuanto al efecto de la suplementación de OU en los géneros estudiados, no se observó diferencias ($p > 0.05$) en la abundancia relativa de *Lactobacillus*, *Faecalibacterium* y *E. coli*, con relación al tratamiento testigo; mientras la de *Campylobacter* fue mayor en los animales suplementados con OU ($p < 0.05$) (Figura 1; Figura 2).

Million *et al*. (2012), reportaron que varias de las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* están asociadas a la ganancia de peso tanto en humanos como en animales, además, poseen un efecto probiótico por lo que son consideradas parte de la MI benéfica. En cerdos sanos, se ha observado que *Lactobacillus* es uno de los principales géneros, además se ve incrementado en el ciego y heces de cerdos que presentan una mayor eficiencia alimenticia (Yang *et al*., 2017; Bergamaschi *et al*., 2020). En el presente trabajo, la adición de OU no tuvo un efecto en la abundancia relativa de *Lactobacillus* ($p > 0.05$), esto con relación al testigo. Si bien, la abundancia de este género usualmente disminuye posterior al destete conforme el animal crece, se han reportado en estudios como el de Wang *et al*., (2020) y Choy *et al*., (2014) un incremento significativo de este género al adicionar orujo o extracto de uva en dietas para lechones, por lo que se esperaba un resultado similar. Lo anterior, resulta contrastante con el estudio de Grosu *et al*., (2020) en donde suplementaron a cerdos destetados con peso medio de 9.13 kg con harina de semilla de uva, la cual, se asoció con la disminución de *Lactobacillus*, atribuido por los autores al tipo de compuestos fenólicos en la harina y su concentración. De igual forma, la harina de semilla de uva disminuyó la proliferación de *Faecalibacterium*, sin embargo, este género se asoció a niveles significativamente altos de butirato.

Por otro lado, Quan *et al*., (2020) encontraron una asociación del género *Faecalibacterium*, con la eficiencia alimenticia. A pesar de que, otros estudios como el de McCormack *et al*. (2019) y Niu *et al*., (2019) reportaron una menor abundancia de *Faecalibacterium* en heces de cerdos con mayor eficiencia alimenticia, no se puede asociar directamente este género con una eficiencia alimenticia deficiente debido a su capacidad de producir butirato, el cual posee actividad antiinflamatoria y se relaciona benéficamente con el aprovechamiento del alimento. Grosu *et al*. (2020). Además, *Faecalibacterium prausnitzii* es considerado como un probiótico de nueva generación (Almeida *et al*., 2020). Este género, es también asociado al consumo de antibióticos promotores de crecimiento y al consumo de fibra lo cual puede influir en su abundancia en el intestino (Koh *et al*., 2016; Broom, 2018; Pluske y Zentek, 2019*b*). Estudios como el de Massacci *et al*. (2020), reportaron que el destete tardío puede también promover la proliferación de *Faecalibacterium*, permitiéndole al animal acumular una mayor abundancia de microrganismos benéficos antes del destete, y así, disminuir la disbiosis intestinal posterior a esta etapa de gran estrés y riesgo para el animal. Lo cual, hace a este género bacteriano importante de evaluar en la etapa de finalización, esperando un efecto positivo de la suplementación del OU sobre la proliferación de este género, con el objetivo de reducir problemas infecciosos en los animales y mantener una mejor salud intestinal. Sin embargo, no se observó en el presente estudio, un incremento significativo ($p > 0.05$) en la abundancia de *Faecalibacterium* con la suplementación. Esto, se puede atribuir a la alta abundancia relativa de *E. coli*, en relación con los demás géneros de interés, ya que se ha observado en lechones destetados desafiados con *E. coli*, que la abundancia de *Faecalibacterium* y Lactobacillus se ve disminuida, mientras que *Campylobacter* incrementa (Kaevska *et al*., 2016), un comportamiento similar a lo observado en el presente trabajo en cerdos finalizadores.

En cuanto a *Campylobacter*, su abundancia relativa incrementó ($p < 0.05$) con la suplementación de OU. En parte,

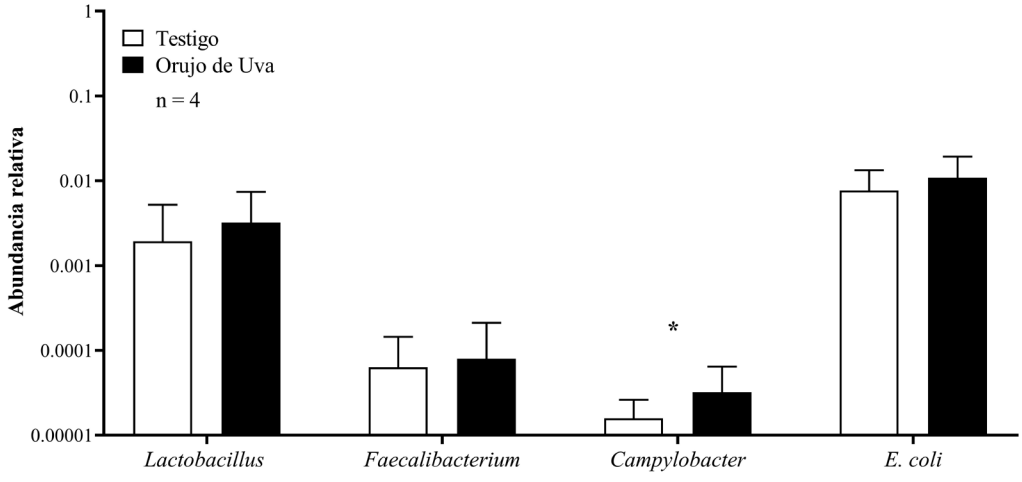


Figura 2. Abundancia relativa de los géneros bacterianos al final de la suplementación. La abundancia relativa se obtuvo de cuatro animales por tratamiento seleccionados aleatoriamente y se representaron en Log_{10}. *La diferencia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA, considerando las abundancias relativas previas a la suplementación como covariable.
Figure 2. Relative abundance of bacterial genera at the end of supplementation. The relative abundance was obtained from four randomly selected animals per treatment and represented in Log10. *Difference between treatments was evaluated by ANOVA, considering the relative abundances prior to supplementation as a covariate.

similar a lo encontrado en este trabajo, Williams *et al*., (2017) reportaron que la adición en un 5 % de OU rico en polifenoles a una dieta basal para cerdos machos y hembras de 7 - 8 semanas de edad, además de disminuir la abundancia relativa del género *Lactobacillus*, incrementó la de *Campylobacter*. Mientras que Kafantaris *et al*. (2018), evaluaron la suplementación de un ensilaje con 9 % de OU durante 30 d como aditivo alimentario en la dieta de 24 lechones destetados con 20 d de edad, y observaron que *Campylobacter* sí se vio disminuida. Además, mejoró el crecimiento de bacterias probióticas facultativas (hasta en 1.2 log UFC/g) y bacterias ácido-lácticas (hasta 2.0 log UFC/g) significativamente. Sin embargo, en este estudio, para la evaluación del crecimiento bacteriano se incubaron previamente en medios de cultivo en incubadoras termoestables y su crecimiento se expresó en log UFC/g, lo cual podría tener menos exactitud que la determinación por alguna técnica molecular.

Bacterias patógenas, como las pertenecientes al género *Escherichia*, se han correlacionado negativamente con la ganancia de peso diaria y el peso de la canal de cerdos de engorde, mientras que cerdos más magros se reporta una menor abundancia de estas bacterias en el íleon y ciego. De igual forma, la reducción en la abundancia de bacterias patógenas se relaciona con la reducción de la inflamación intestinal (Yang *et al*., 2016; Torres-Pitarch *et al*., 2020; Gardiner *et al*., 2020). De hecho, *Escherichia coli* enterotoxígena (ETEC) es el patógeno epidémico transmitido por alimentos más común que causa diarrea. La cual, es desencadenada por las adhesinas fimbriales y la enterotoxina, que promueven que las bacterias patógenas se adhieran a las células epiteliales intestinales y provoquen alteración de los electrolitos y un desequilibrio ácido-base (Fleckenstein *et al*., 2010; Liu *et al*., 2017; Bin *et al*., 2018). Por lo anterior, es de gran importancia encontrar alternativas alimentarias que contribuyan a mitigar la proliferación de estos patógenos y su efecto en el comportamiento productivo animal.

Se ha observado, que suplementos ricos en compuestos fenólicos, principalmente en proantocianidinas pueden actuar controlando bacterias patógenas como *E. coli*, evitando futuros problemas infecciosos en los cerdos (Verhelst *et al*., 2014). Sin embargo, en el presente trabajo no se presentaron cambios en la abundancia relativa ($p > 0.05$) de *E. coli* con la suplementación, coincidiendo con lo reportado por Wang *et al*. (2020), donde reportan que si bien, *E. coli* incrementó un poco con la suplementación de OU, este incremento no fue significativo.

El efecto moderado de la suplementación de OU en la MI es principalmente atribuido al contenido y tipo de compuestos fenólicos en el orujo y su nivel de inclusión en la dieta, así como también pudo influir la variedad de uva, el hecho de que se suplementó como una harina y la composición de ésta.

CONCLUSIONES

La suplementación con OU en la dieta de cerdos finalizadores tuvo un efecto positivo en la ganancia de peso, esto sugiere que la suplementación de este subproducto a los cerdos en finalización podría disminuir los tiempos de producción, permitiendo que el animal llegue más rápido al peso deseado eficientizando los costos de producción.

La administración dietaria de OU mostró un efecto solo en la abundancia de *Campylobacter*. Aunque no se observó el comportamiento esperado en la microbiota intestinal, es importante considerar que el OU podría tener un efecto beneficioso en la salud intestinal debido a su influencia en otras poblaciones o géneros microbianos no evaluados en este estudio. Por lo tanto, se sugiere que futuras investigaciones aborden la evaluación de estas poblaciones no considerados, así como la determinación de dosis óptimas para maximizar los posibles beneficios del OU.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), por la beca de posgrado otorgada a Kevin Alberto Avilés Peterson. Así como también al Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones para el trabajo experimental.

CONFLICTOS DE INTERES

Los autores declaran no hay ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

AOAC. 2005. Official method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington D.C.

Almeida, D., Machado, D., Andrade, J.C., Mendo, S., Gomes, A.M. y Freitas, A.C. 2020. Evolving trends in next-generation probiotics: a 5W1H perspective. Critical Review in Food Science and Nutrition. 60(11):1783-1796.

Alter, T., Gaull F., Kasimir S., Gürtler M., Mielke H., Linnebur M., Fehlhaber K. 2005. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. Strains within multiple pig farms. Veterinary Immunology. 108(3-4): 251-261.

Balbinoti, T.C.V., Stafussa, A.P., Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Sassaki, G.L., Jorge L.M.D.M. y Jorge R.M.M. 2020. Addition of grape pomace in the hydration step of parboiling increases the antioxidant properties of rice. International Journal of Food Science and Technology. 55(6): 2370-2380.

Bergamaschi, M., Tiezzi, F., Howard, J., Huang, J.Y., Kent, A. G. Schillebeeckx, C., McNulty, N. P. y Maltecca, C. 2020. Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine. Microbiome 8 (110): 1-15.

Bin, P., Tang, Z., Liu, S. Chen, S., Xia, Y., Liu, J., Wu, H., y Zhu, G. 2018. Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. BMC Veterinary Research 14(385): 1-13.

Broom, L.J. 2018. Gut barrier function: effects of (antibiotic) growth promoters on key barrier components and associations with growth performance. Poultry Science. 97(5): 1572-1578.

Carlson, M.S. y Fangman, T.J. 2018. Swine antibiotics and feed additives: food safety considerations. Department of Animal Sciences, University of Missouri-Columbia.

Casagrande, M., Zanela, J., Pereira, D., de Lima, V.A., Oldoni, T.L.C. y Carpes, S.T. 2019. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. Journal of Food Measurement and Characterization. 13(2):1120-1129.

Chedea, V.S., Palade, L.M., Marin, D.E., Pelmus, R.S., Habeanu, M., Rotar, M.C., Gras, M.A., Pistol, G.C. y Taranu I. 2018. Intestinal absorption and antioxidant activity of grape pomace polyphenols. Nutrients. 10(5): 588.

Choy, Y.Y., Quifer-Rada, P., Holstege, D.M., Frese S.A., Calvert, C.C., Mills D.A., Lamuela-Raventos, R.M. y Waterhouse, A.L. 2014. Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins. Food & Function. 5(9): 2298-2308.

CODEX. 1997. Límites máximos del codex para residuos de medicamentos veterinarios. [Consultado 12 de Septiembre del 2022]. Disponible en: http:www.apps1.fao.org.

CORDIS. 2022. [Consultado 12 de Marzo 2023]. Disponible en: https://cordis.europa.eu/article/id/20620-regulation-bans-antibiotics-as-growth-promoters-in-animal-feed/es .

De Rodas, B., Youmans, B.P., Danzeisen, J.L., Tran, H. y Johnson, T.J. 2018. Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. Journal of Animal Science. 96(5): 1778-1794.

Echegaray, N., Munekata, P.E.S., Centeno, J.A., Pateiro, M., Carballo, J. y Lorenzo, J.M. 2021. Total phenol content and antioxidant activity of different celta pig carcass locations as affected by the finishing diet (chestnuts or commercial feed). Antioixidants. 10(5):1-19.

Fleckenstein, J.M., Hardwidge, P.R., Munson, G.P. Y Rasko, D.A. 2010. Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. Microbes & Infection. 12(2):89-98.

Furet, J.P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J. y Corthier, G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. FEMS Microbiology Ecology. 68(3): 351-362.

Gardiner, G.E., Metzler-Zebeli, B.U., Lawlor, P.G. 2020. Impact of intestinal microbiota on growth and feed Efficiency in Pigs: A Review. Microorganisms. 28;8(12):1886.

Grosu, I. A., Pistol, G.C., Marin, D.E., Cismileanu, A., Palade. L.M., y Taranu I., 2020. Effects of dietary grape seed meal bioactive compounds on the colonic microbiota of weaned piglets with dextran sodium sulfate-induced colitis used as an inflammatory model. Frontier Veterinary Science. 7(31):1-14.

Guevarra, R.B., Hong, S.H., Cho, J.H., Kim, B.R., Shin, J., Lee, J.H., Kang, B.N., Kim, Y.H., Wattanaphansak, S., Isaacson, R.E., Song, M. y Kim H.B. 2018. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. Journal of Animal Science and Biotechnology. 9(1): 1-9.

Halmos, E.P., Christophersen, C.T., Bird, A.R., Shepherd, S.J., Gibson, P.R. y Muir J.G. 2015. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. Gut. 64(1): 93-100.

Hao, R, Li, Q., Zhao, J., Li, H., Wang, W., y Gao, J. 2015. Effects of grape seed procyanidins on growth performance, immune function and antioxidant capacity in weaned piglets. Livestock Science. 17: 237-242

Koh, A, De Vadder, F, Kovatcheva-Datchary, P., y Bäckhed F. 2016. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell. 65(6):1332-1345.

Hintze, J. 2007. NCSS, PASS y GESS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah.

Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M. y Savelkoul P.H. 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology. 40(12)z. 4423-4427.

Kaevska, M., Lorencova, A., Videnska, P., Sedlar, K., Provaznik, I. y Trckova M. 2016. Effect of sodium humate and zinc oxide used in prophylaxis of post-weaning diarrhoea on faecal microbiota composition in weaned piglets. Veterinární Medicína. 61(6): 328-336.

Kafantaris, I., Stagos, D., Kotsampasi, B., Hatzis, A., Kypriotakis, A., Gerasopoulos, K., Makri, S., Goutzourelas N., Mitsagga, C., Giavasis, I., Petrotos, K., Kokkas, S., Goulas P., Christodoulou, V. y Kouretas, D. 2018. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. Animal. 12(2): 246-255.

Kim, H.B. y Isaacson, R.E. 2015. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. Veterinary Microbiology. 177(3-4): 242-251.

Kumanda, C., Mlambo, V. y Mnisi, C.M. 2019. From landfills to the dinner table: Red grape pomace waste as a nutraceutical for broiler chickens. Sustainability. 11(7): 1931.

Liu, G., Ren, W., Fang, J., C-AA, H., Guan, G., Al-Dhabi, N.A., Yin, J., Duraipandiyan, V., Chen, S., Peng, Y., Yin Y. 2017. L-glutamine and l-arginine protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection via intestinal innate immunity in mice. Amino Acids. 49(12):1945-1954.

Livak, K.J. y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25(4): 402-408.

Looft, T., Johnson T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul,W.J., Stedfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. y Stanton, T.B. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109(5): 1691-1696.

Luo, Y., Ren, W., Smidt, H., Wright, A.D.G., Yu, B., Schyns G., McCormack, U.M., Cowieson, A.J., Yu, J., He J., Yan, H., Wu J., Mackie, R.I. y Chen, D. 2022. Dynamic distribution of gut microbiota in pigs at different growth stages: composition and contribution. Microbiology Spectrum. 10(3): 1-15.

McCormack, U. M., Curiao, T., Metzler-Zebeli, B. U., Magowan, E., Berry, D. P., Reyer, H., *et al*. 2019. Porcine feed efficiency-associated intestinal microbiota and physiological traits: finding consistent cross-locational biomarkers for residual feed intake. mSystems. 4(4):e00324-18.

Massacci, F. R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jardet, D., y Estellé, J. 2020. Late weaning is associated with increased microbial diversity and *Faecalibacterium prausnitzii* abundance in the fecal microbiota of piglets. Animal Microbiome. 2(1):1-12.

Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L. y Raoult, D. 2012. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. Microbial pathogenesis. *53*(2):100-108.

National Research Council (NRC). 2012. Nutrient requirements of swine: 11th Revised Edition. The National Academies Press. Washington, DC.

Niu Q, Li P, Hao S, Zhang Y, Kim SW, Li H, Ma, X., Gao, S., He, L., Wu, W., Huang, X., Hua, J., Zhou, B., y Huang, R.. 2015. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. Science. Report. 5:9938.

Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, trato humanitario en la movilización de animales. [Consultado 22 Marzo 2022]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998

Park, Y.K., Ikegaki, M., Abreu, J.A. da S. y Alcici, N.M.F. 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Food Science and Technology. 18(3): 313-318.

Pluske, J.R., Miller, D.W., Sterndale, S.O. y Turpin, D.L. 2019*a*. Associations between gastrointestinal-tract function and the stress response after weaning in pigs. Animal Production Science. 59(11): 2015-2022.

Pluske, J.R. y Zentek, J. 2019*b*. Gut nutrition and health in pigs and poultry. En Poultry and Pig Nutrition. Hendriks, W. H., Verstegen, M. W. A., y Babinszky, L (ed.), pp 77-95. Wageningen Academic Publishers.

Pomar, C. y Remus, A. 2019. Precision pig feeding: a breakthrough toward sustainability. Animal Frontiers. 9(2): 52-59.

Quan, J., Wu Z., Ye Y., Peng L., Wu J., Ruan D., Qiu Y., Ding R., Wang X., Zheng E., Cai G., Huang W. y Yang J. 2020. Metagenomic characterization of intestinal regions in pigs with contrasting feed efficiency. Frontier Microbiology. 11(32):1-13.

Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L. y Palva, A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology. 97(6): 1166-1177.

Sehm, J., Treutter, D. Lindermayer, H., Meyer, H.H.D. y Pfaffl, M.W., 2011. The influence of apple- or red-grape pomace enriched piglet diet on blood parameters, bacterial colonisation, and marker gene expression in piglet white blood cells. Food Nutrition. Science. 2: 366-376.

Singleton, V.L. y Rossi, J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Vitivulture. 16: 44-168.

Taranu, I., Habeanu, M., Gras, M.A., Pistol, G.C., Lefter, N., Palade, M., Ropota, M., Sanda Chedea,V. y Marin, D.E. 2018. Assessment of the effect of grape seed cake inclusion in the diet of healthy fattening-finishing pigs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 102(1): e30-e42.

Taranu, I., Hermenean, A., Bulgaru, C., Pistol, G.C., Ciceu, A., Grosu, I.A. y Marin D.E. 2020. Diet containing grape seed meal by-product counteracts AFB1 toxicity in liver of pig after weaning. Ecotoxicology and Environmental Safety. 203: 110899.

Tayengwa, T., Chikwanha, O. C., Raffrenato, E., Dugan, M. E., Mutsvangwa, T., y Mapiye, C. 2021. Comparative effects of feeding citrus pulp and grape pomace on nutrient digestibility and utilization in steers. Animal, 15 (1): 100020.

Tayengwa, T., Chikwanha, O.C., Dugan, M.E.R., Mutsvangwa, T., y Mapiye, C. 2020. Influence of feeding fruit by-products as alternative dietary fibre sources to wheat bran on beef production and quality of Angus steers. Meat Science. 161: 107969.

Torres-Pitarch, A., Gardiner, G.E., Cormican, P., Rea, M., Crispie, F., O'Doherty, J.V., Cozannet, P., Ryan, T., Cullen, J., y Lawlor, P.G. 2020. Effect of cereal fermentation and carbohydrase supplementation on growth, nutrient digestibility and intestinal microbiota in liquid-fed grow-finishing pigs. Science Reports. 10(1):13716.

Verhelst, R., Schroyen, M., Buys, N. y Niewold, T. 2014. Dietary polyphenols reduce diarrhea in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infected post-weaning piglets. Livestock Science. 160: 138-140.

Wang, R., Yu H., Fang, H., Jin, Y., Zhao, Y., Shen, J. y Zhang, J. 2020. Effects of dietary grape pomace on the intestinal microbiota and growth performance of weaned piglets. Archives of Animal Nutrition. 74(4): 296-308.

Williams, A.R., Krych, L., Fauzan Ahmad, H., Nejsum, P., Skovgaard, K., Nielsen, D.S. y Thamsborg, S.M. 2017. A polyphenol-enriched diet and *Ascaris suum* infection modulate mucosal immune responses and gut microbiota composition in pigs. PLoS One. 12(10): e0186546.

World Health Organization. 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. World Health Organization. [Consultado 12 de abril del 2023]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/handle/10665/44812.

Yang, H., Huang, X., Fang, S., Xin, W., Huang, L., y Chen, C. 2016. Uncovering the composition of microbial community structure and metagenomics among three gut locations in pigs with distinct fatness. Science Reports 6:27427.

Yang, H., Huang X., Fang S., He M., Zhao Y., Wu Z., Yang M., Zhang Z., Chen C., y Huang L. 2017 Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. Frontier Microbiology. 8:1555.

Young, C.R., Harvey, R., Anderson, R., Nisbet D., y Stanker, L.H. 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. Research in Veterinary Science. 68(1): 75-78.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Effect of temperature on the stability of *Cosmos bippinatus* pigments encapsulated by freeze-drying

Efecto de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos de *Cosmos bipinnatus* encapsulados por liofilización

José Eduardo Gallardo-Sánchez[1], Juan Orozco-Villafuerte[2], Leticia Buendía-González[1], José Alvarez-Ramirez[3], Carmen Hernández-Jaimes[1]

[1] Facultad de Ciencias, Campus El Cerrillo Piedras Blancas, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Toluca 50200, México.

[2] Facultad de Química, Campus El Cerrillo Piedras Blancas, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Toluca 50200, México.

3 Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Iztapalapa, Ciudad de México, México.

ABSTRACT

Color is one of the most important attributes, especially in the food industry. Currently, alternative sources are being sought to obtain plant pigments, due to their bioactive properties. *Cosmos bipinnatus* is a plant known for its high anthocyanins content, molecules that give it color and have antioxidant properties. However, once they are extracted from the plant matrix, they present instability problems, which is why their protection is necessary. In this work, the extraction of *C. bipinnatus* pigments was carried out, which were encapsulated by freeze-drying as a protection method. During encapsulation, two wall materials (gum arabic (GA) and maltodextrin (M)) were evaluated alone and in combination. The microencapsulates were characterized to determine the encapsulation efficiency and performance. In addition, pigment release kinetics were carried out at three temperatures (4 °C, 25 °C, and 65 °C) to find the conditions at which the pigments are best preserved. It was found that encapsulation by freeze-drying is an efficient method, with no significant difference when the materials are used alone or combined, and that the plant pigments obtained from *C. bipinnatus* (PPCb) are better preserved at temperatures below 25°C.

Keywords: Plant pigment, encapsulation by freeze-drying, release kinetics.

RESUMEN

El color es uno de los atributos más importantes, sobre todo en la industria alimentaria. Actualmente se están buscando fuentes alternas para la obtención de pigmentos vegetales, debido a sus propiedades bioactivas. *Cosmos bipinnatus* es una planta conocida por su alto contenido de antocianinas, moléculas que le aportan color y que tienen propiedades antioxidantes, sin embargo, una vez que son extraidas de la matriz vegetal suelen ser inestables, por lo que es necesaria su protección. En este trabajo se realizó la extracción de los pigmentos de *C. bipinnatus* los cuales fueron encapsulados por liofilización como método de protección. Durante la encapsulación se evaluaron dos materiales de pared (goma arábiga (GA) y maltodextrina (M) solos y en combinación. Los microencapsulados obtenidos fueron caracterizados para determinar la eficiencia y rendimiento de encapsulación, además se realizaron cinéticas de liberación de los pigmentos a tres temperaturas (4 °C, 25 °C y 65 °C) para encontrar las condiciones a las cuales los pigmentos se conservan de mejor manera. Se encontró que la encapsulación por liofilización es un método eficiente, que no hay diferencia significativa cuando los materiales se usan solo o combinados y que los pigmentos vegetales obtenidos de *C. bipinnatus* (PPCb) se conservan mejor a temperaturas por debajo de los 25 °C.

Palabras clave: Pigmento vegetal, encapsulación por liofilización, cinéticas de liberación.

INTRODUCTION

Plant pigments, also known as natural dyes, are the chemical substances that provide color to plants, mainly fruits and vegetables. They are produced by plants as secondary metabolites with a particular purpose such as; attracting pollinators, promoting light capture during photosynthesis, protecting against oxidative damage, repelling insects or any other organism that could cause damage to the plant, in addition to participating in its development and metabolism (Fernández-López *et al*., 2020).

In recent years, the use of these pigments has increased in various areas such as cosmetics, pharmaceuticals, textiles, and food mainly (Rodríguez-Mena *et al*., 2023; Nambela, 2023; Pasdaran *et al*., 2023). Color is one of the most important parameters of foods since it can make them more attractive and appetizing, therefore, favor consumer acceptance (Juric *et al*., 2022). Recently, interest in plant pigments and their application in foods has increased, because they are considered natural and healthy, compared to synthetic dyes to which health problems have been attributed, such as asthma, allergies, and tumor development (Mota *et al*., 2023). It is worth mentioning that most plant pigments have additional characteristics to color, including activities such as antioxidant, anticancer, antimutagenic, and antithrom-

*Author for correspondence: Carmen Hernández-Jaimes1
e-mail: carmenhernandezjaimes@gmail.com
Received: January 18, 2024
Accepted: July 31, 2024
Published: August 22, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2236

botic, among others, which makes them bioactive pigments and as a consequence, they can be used as ingredients in the production of functional foods (Hui *et al*., 2018). These properties depend on the chemical compounds that make up these pigments. According to Ghosh *et al*. (2022), plant pigments are classified as a) pyrrole derivatives (chlorophyll), b) isoprenoid derivatives (carotenoids), c) flavonoid derivatives (anthocyanins), and d) heterocyclic nitrogen derivatives (betalains).

Currently, some pigments obtained from vegetable sources such as beet (*Beta bulgaris*), carrot (*Daucus carota*), jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), annatto (*Bixa orellana*), spinach (*Spinacia oleracea*), purple cabbage (*Brassica oleracea*), etc., are already on the market (Rodríguez-Mena *et al*., 2023), however, due to the high industrial demand for pigments and the wide range of shades necessary to cover the needs of the industry, alternative sources continue to be sought to obtain these pigments. Many plants could be potential sources of bioactive pigments, such as the case of *C. bipinnatus*, a plant rich in anthocyanins (Ninama *et al*., 2024), to which antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties have been attributed (Kulichenco *et al*., 2022; Bhuiyan *et al*., 2023). Gutierrez *et al*. (2023) used it to make rabbit chorizo to evaluate its influence on texture, color, and water activity, finding that there are no differences ($p > 0.05$) in texture and color, except for the internal value and for water activity ($p < 0.05$). However, despite previous studies, more research is needed to consider it as a potential source of bioactive pigments for industrial use.

Vegetable pigments have very attractive properties for the industry, however, they also have a disadvantage and that is that once they are extracted from the plant matrix they are generally unstable to factors such as light, pH, temperature, oxygen, or during food processing (Jurić *et al*., 2022). This is why once they are extracted they must be protected from degradation. For this, various methods have been proposed, the most used is encapsulation using various wall materials, mainly biopolymers such as chitosans, alginates, rubbers, etc. Currently, spray drying is one of the most used encapsulation methods in the industry, which consists of atomizing the solution or emulsion composed of the bioactive pigment and the wall materials, forming a cloud of droplets that come into contact with hot steam causing the water to evaporate and a dry product is obtained (Piñón-Balderrama *et al*., 2020). However, this method is not the most appropriate when it comes to thermolabile pigments, since contact with hot steam produces a certain degree of degradation of the compounds. A relatively recent alternative is encapsulation by lyophilization, which consists of preparing a solution containing plant pigments and wall materials. Subsequently, it is ultra-frozen, subjected to a vacuum to eliminate water, and finally, the encapsulated pigment is obtained (Menegazzi *et al*., 2020). This technique is a very good option for encapsulating thermolabile chemical compounds since, as it does not involve high temperatures, the compounds are better protected. It is worth mentioning that with this encapsulation method, microencapsulates in the form of flakes are obtained that have an encapsulation and release efficiency similar to that obtained by the spray drying method (Ballesteros *et al*., 2017).

Based on the above, in this work plant extracts were obtained from *C. bipinnatus*, which were encapsulated by the freeze-drying method. The microencapsules were characterized and the release and protection of the main chemical compounds (phenols and anthocyanins) present were evaluated. This is to evaluate their potential use as bioactive pigments in the food industry.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7, 8-tetramethychroman-2carboxylic acid (TROLOX), quercitin 3-O-glucoside (isoquercitrin), folin ciocalteu reagent 1N, and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum trichloride ($AlCl_3$), potassium chloride buffer, sodium acetate buffer, and potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), were obtained from J.T. Baker. S.A. de C.V. The solvents used were ethanol (EtOH), and methanol (MeOH) (J.T. Baker, Mexico City, Mexico). Distilled water was used in all the experiments.

Plant sample preparation

The purple sunflower flowers (*C. bipinnatus*) were collected at the El Cerrillo Campus of the Autonomous University of the State of Mexico, during September and October of 2022, coordinates 19° 24' north latitude and 99° 41' west longitude, at an altitude of 2,610 m above sea level. The flowers were stripped of their petals, these being the raw material to work. Petals were selected, discarding the damaged or discolored ones, they were subsequently deep-frozen at -85 °C, and freeze-dried until obtaining a fine powder. This was stored in amber glass bottles, in darkness, and at room temperature until later use.

Obtaining plant pigments

The pigments were obtained following the Baite *et al*. (2021) methodology with some modifications. The maceration extraction method was used, assisted by ultrasound, using ethanol-water (80:20) as a solvent. The fine powder obtained in the previous step was dissolved in the solvent at a concentration of 6 mg/mL, subsequently placed under stirring for 5 minutes, then subjected to sonication in an ultrasonic bath at 40°C for 40 min. Subsequently, the sample was subjected to stirring for one hour (120 rpm and 40°C), then filtered under vacuum. This last step was carried out twice to ensure the elimination of solids. Ethanol was removed using a rotary evaporator. The resulting sample was deep frozen (-80 °C) and subjected to freeze-drying for 24 hours, thus obtaining a solid which was called dry extract. For subsequent tests, the dry extract was resuspended in water at a concentration of 6 mg/mL.

Measurement color

The color of the samples was measured based on the CIELab color space system, following the methodology reported by Nguyen and Bechtold (2021). A colorimeter (Konica Minolta® Chroma Meter CR 400, Japan) was used. A 10 mL aliquot of the sample was taken and the colorimeter was used to determine the L*, a*, and b* values.

Phytochemical characterization of PPCb

Quantification of total phenols

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method according to the methodology reported by Ladeska *et al*. (2022) with slight modifications. Two-hundred µL of the sample were placed in a test tube and 100 µL of Folin's reagent were added; it was homogenized and left to rest for 8 min in the dark, then 200 µL of sodium carbonate (14 g/100 mL) and 1.5 mL of distilled water were added, it was homogenized again, leaving it to rest for 60 minutes. Finally, the absorbance was measured at a wavelength of 765 nm in a UV-VIS spectrophotometer. A standard curve was carried out with gallic acid (0.05 - 0.8 mg/mL), and the results obtained were reported as equivalents of gallic acid (EAG) in mg/g dry basis.

Quantification of flavonoids

The quantification of flavonoid content was carried out following the method reported by da Silva *et al*. (2022), with slight modifications. To an aliquot of 1000 µL of sample, 500 µL of 2 % aluminum chloride and 500 µL of distilled water were added, the mixture was homogenized and incubated for 10 min in the dark. Subsequently, absorbance was measured at 425 nm using a UV-VIS spectrophotometer. A standard curve was performed with quercetin (0.005 - 0.85 mg/mL). The results were reported as quercetin equivalents (EQ) in mg/g dry basis.

Quantification of total anthocyanin

The determination of anthocyanin content was carried out using the method reported by Sethi *et al*. (2020), with some modifications. Two buffers were prepared, one of 0.025 M potassium chloride (KCl) with a pH value of 1.0, and another of 0.4 M sodium acetate (CH_3CO_2Na) at pH of 4.5. Two 2 mL aliquots of the sample were taken, one aliquot was diluted with the pH 1.0 buffer and the second with the pH 4.5 buffer, subsequently a scan from 400 to 700 nm was performed in a UV-VIS spectrophotometer and the maximum absorbance peak was determined.

The amount of anthocyanins was calculated using the following equation:

$$Total\ anthocyanins = \frac{(A)(MW)(FD)(1000)}{\varepsilon \times W} \quad (1)$$

Where:

A is $(Abs_{max} - Abs_{700})_{pH=1.0} - (Abs_{max} - Abs_{700})_{pH=4.5}$

MW is the molecular weight of anthocyanin (449.02 g/mol)

DF: Dilution factor

ε: Molar extinction coefficient (26,900 L/cm mol)

Determination of antioxidant capacity

The determination of antioxidant capacity was carried out using the ABTS method reported by Cheng *et al*. (2016), with some modifications. For the preparation of the ABTS solution, 5 mL of 7 mM ABTS were mixed with 88 µL of 2.45 mM potassium persulfate, leaving this solution to stand for 12 hours in the dark. The previous solution was diluted with methanol until obtaining an absorbance of 0.740 at 734 nm. A reaction was carried out by combining 50 µL of the extract sample with 1.5 mL of ABTS solution, homogenized, and incubated for 10 min in the dark. Subsequently, the absorbance was measured against a blank at 734 nm in a spectrophotometer.

The percentage of inhibition of antioxidant capacity was calculated using the following equation:

$$\%\ inhibition = \frac{A0 - A1}{A0} * 100 \quad (2)$$

Where A0 is the absorbance of the control and A1 is the absorbance of the extract. A standard curve was performed with Trolox (0.1 - 0.75 mM). The results obtained were reported as milligrams of trolox equivalent (mgTEAC).

Microencapsulation of PPCb

The method of Stoll *et al*. (2016), with slight modifications, was used for pigment encapsulation. Three formulations were prepared, one using M as wall material (30 %), another using GA (30 %), and the third forming a combination of both materials (15 % M and 15 % GA), all using the pigment aqueous as material to be encapsulated (70 %).

The aqueous pigment was mixed with the solution of wall material dissolved in water in a fixed proportion (30 - 70 respectively). The mixture obtained was homogenized in an IKA T50 digital ULTRA TURAX, for three periods of two minutes with a minute of rest between each one, until the complete homogenization of the materials was achieved. The resulting mixture was subjected to two freeze-drying periods, each lasting 24 h, thus obtaining a microencapsulated material that was pulverized in a mortar and sieved through a 100 mm sieve. The microencapsulate obtained was used for subsequent tests.

Determination of encapsulation yield

The calculation of the encapsulation yield (Y) was carried out following the methodology reported by Sharayei *et al*. (2020) with slight modifications. The calculation was obtained using equation 3, based on dry matter measurement:

$$Y = \frac{Microencapsulated\ powder\ (g)}{Pigment\ (g) + wall\ materials\ (g)} * 100 \quad (3)$$

Determination of moisture content

Moisture content was carried out using the method described by Thakur and Thakur (2020). A sample of 1 g of each formulation was taken and placed in an oven at 65 °C for 48 h until a constant weight was obtained. To determine the percentage of moisture in the microencapsulation, the final weight (PF) was divided by the initial weight (PI) according to the following equation:

$$\%\ Humidity = \frac{PF}{PI} * 100 \quad (4)$$

Apparent density ()

To determine the density of the microcapsules, the method described by Kaderides *et al*. (2015) was used. 500 mg of microencapsulated sample of each formulation were placed in a test tube and shaken to eliminate air, this was done until a constant volume was obtained. The apparent density ($\rho_{A\rho}$) was obtained by dividing the mass (m) by the given volume (V) as expressed in equation 5.

$$\rho_{A\rho} = \frac{m}{v} \quad (5)$$

Microencapsulation efficiency

To determine the microencapsulation efficiency, the method described by Stoll *et al*. (2016) with slight modifications, was used. For this calculation, the total phenol content in the sample was used as a reference. Three data were included, the total amount of phenols introduced into the microencapsulate (FT), the number of phenols on the surface of the microencapsulate (FS), and the amount of phenols quantified in the microencapsulate at the final moment of the release kinetics (FL) (this data was obtained from the release kinetics described previousy). To obtain the surface phenols, a 100 mg sample of the microencapsulate was taken, suspended in 1 mL of ethanol-methanol (1:1), vortexed for one minute, and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The phytochemical analysis for total phenols previously described previously was carried out on the supernatant. These surface phenols were subtracted from the phenols quantified in the release kinetics, and the result was divided between the phenols introduced in the microencapsulation and then it was multiplied by 100, according to the following equation:

$$\%ME = \frac{FL - FS}{FT} * 100 \quad (6)$$

Scanning electron microscopy

To observe the morphological structure of the microencapsules, scanning electron microscopy was used following the methodology of da Silva *et al*. (2023) with some modifications. The samples were placed on the sample holder and fixed with double-sided adhesive tape and covered with a thin layer of gold. A Thermo ScientificTM PrismaTM E (Waltham, MA, USA) SEM was used under an accelerating voltage of 15 kV at a speed of 80 s and a current of 40 mA. The samples were examined at 55x magnifications.

PPCb release kinetics

The release kinetics of the microencapsulation were carried out based on the method described by Orozco-Villafuerte *et al*. (2018) with slight modifications. The microencapsulate was placed in distilled water at a concentration of 100 mg/mL, at room temperature (25°C ± 1), and shaken gently. A 2 mL aliquot was taken every 5 min for one hour. The aliquots obtained were analyzed for phenols, anthocyanins, antioxidant capacity and color, following the phytochemical and colorimetric methodologies mentioned above. This procedure was carried out on the encapsulations obtained with the two wall materials and their mixture. Based on the release percentage of the phytochemical compounds, the formulation containing the mixture of the two wall materials was chosen to evaluate the release of the extract at different temperatures. Two release kinetics similar to the one described above were carried out, but now using two temperatures (4 °C and 65 °C). Phytochemical and color analyzes were also carried out on the aliquots obtained.

Statistical analysis

All tests were carried out in triplicate and the results were analyzed using an ANOVA and a Tukey comparison of means test with a confidence level of 95 % ($P < 0.05$), using Statgraphics Centurion XVIII software.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtaining the plant pigment from the petals of *C. bipinnatus*

As a result of the plant pigments extraction, a purple powder was obtained (Figure 1a), which was suspended in distilled water at a concentration of 6 mg/mL to observe its dyeing power. A purple-reddish solution was obtained with a pH value of 4.55 ± 0.05. The solution presented minimum amount of solids that precipitated after it was stirred, this small insoluble portion may be due to the presence of some non-polar compounds contained in the extract. It has been reported that within the content of *C. bipinnatus* flowers, chalcones, and some aromatic ketones can be found (Iwashina *et al*., 2015) that form part of the central nucleus of many important biological compounds, within which contain some hydrophobic residues (Arzola, 2021). The solution obtained was filtered with Whatman No. 1 filter paper using a vacuum

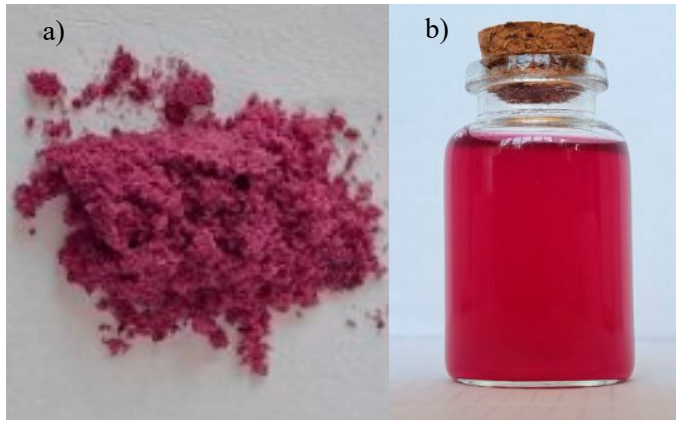


Figure 1. a) Dry extract obtained from the petals of *C. bipinnatus*. b) Dry extract obtained from the petals of *C. bipinnatus* suspended in distilled water.
Figura 1. a) Extracto seco obtenido de pétalos de *C. bipinnatus.* b) Extracto seco obtenido de pétalos de *C. bipinnatus* suspendido en agua destilada.

pump to eliminate non-soluble molecules, obtaining a homogeneous solution, as shown in Figure 1b. It is worth mentioning that homogeneity in colorful solutions is highly desirable.

Color analysis of plant pigment

The color of the extract is reported in CIELab system coordinates (L*, a*, b*) (Table 1). It can be seen that, based on the a* and b* values, the pigment obtained has a red color with little tendency to yellow, the b* coordinate being close to 0 is not visually notable, so the shade of the pigment is mostly purple-reddish (Figure 1b). Regarding luminosity (L*), let us remember that L can take values ranging from 0 to 100, where L=0 is indicative of the absence of luminosity and L=100 is indicative of the maximum luminosity of the color (Konica Minolta, 2023). In the pigment studied, a value of L= 17.94 ± 0.59 was obtained, which is closer to zero, and therefore, plotting the three coordinates (L*, a*, and b*) in CIELab space results in a dark reddish-purple color, as shown in Table 1.

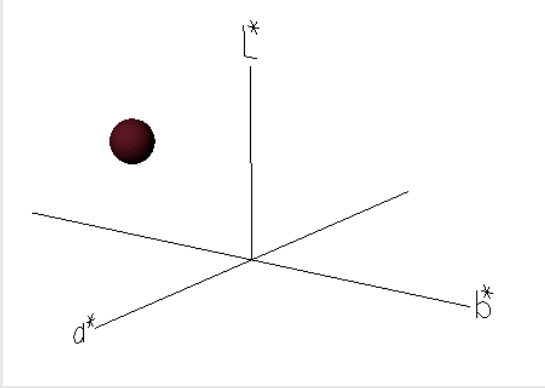
Phytochemical characterization of the plant pigment

The antioxidant capacity of a plant extract is directly related to its chemical composition, mainly to the phenol content (Bijanji *et al*., 2021). Particularly in the *C. bipinnatus* species, it has been reported that its main bioactive chemical components are flavonoids, within which a large proportion are anthocyanins (Iwashina *et al*., 2015). For this reason, in the chemical characterization of the plant pigment, phenols, flavonoids, anthocyanins, and antioxidant capacity were quantified.

The results are expressed in mg of the phytochemical compound per g (dry basis) of the plant pigment (Table 2). *C. bipinnatus*, not being a species currently used as a source of pigments for industry, has a limited number of phytochemical studies in this regard, so there is no standardized extraction method, the concentrations of solvents used are diverse and, as a consequence, the yields obtained are also variable.

The main compounds that gives the petals of *C. bipinnatus* the purple hue are anthocyanins. This purple flower variety has been reported with the highest amount of phenols in its species, having concentrations even more than double compared to white, pink, and orange varieties (Jang *et al*., 2008). This difference in phenols is possibly caused by its higher content of anthocyanins, of which cyanidin-3-glucoside

Tabla 1. Coordenadas L*, a* y b* en el sistema CIELab de los PPCb.
Table 1. L*, a* and b* coordinates of the PPCb in the CIELab system.

Parameters	Plant pigment	CIELab
Luminosity (L*)	17.94± 0.59	
Coordinate (a*)	23.60 ± 3.03	
Coordinate (b*)	4.10 ± 0.35	

Results are expressed as mean ± standard deviation of triplicate measurements.

Tabla 2. Resultados del análisis fitoquímico de los PPCb.
Table 2. Results of phytochemical analysis of PPCb.

Chemical compound	Concentration
Total phenols (mg EAG/g)	95.05 ± 0.51
Total flavonoids (mg EQ/g)	52.40 ± 3.20
Anthocyanins (mgCyn-3glu/g)	3.96 ± 0.22
Antioxidant capacity by ABTS (inhibition %)	89.0 ± 1.55

Results are expressed as mean ± standard deviation of triplicate measurements.

has been reported in the greatest proportion in this plant (Iwashina *et al*., 2015), giving it its characteristic color. The amount of flavonoids and anthocyanins obtained is similar to that reported by Fernandes *et al*. (2019), who used a similar extraction method, maceration, and ultrasonication, with the difference that these authors used water-acetone as solvent. From the petals, they obtained values of 44.5 mg EQ/g dry extract and 4.18 mg Cyn-3-glu / g dry extract, values close to those shown in Table 2, maintaining a similar ratio of anthocyanins - flavonoids. On the other hand, Jang *et al*. (2008) used an extraction method that only involved immersion of the petals in methanol as a solvent and obtained a lower amount of phenols (34.46 mg EAG/g dry extract) than that obtained in the present study (95.05 ± 0.51 mg/g), which suggests that the solvent and the extraction method are key factors to obtain a greater amount of compounds, so we can say that the combination of maceration and ultrasonication is more efficient for the extraction of chemical compounds compared to the use of maceration by itself.

Once anthocyanins are extracted from the plant matrix, they easily undergo degradation reactions, having a very variable stability depending on their structure and the conditions that surround them. These degradation reactions are mainly determined by pH, temperature, light, or oxygen. Thus, the presence of light can promote its degradation, and the absence of water can improve this stability (Wrolstad *et al*., 2005). Regarding the results of the antioxidant capacity, an 89.0 ± 1.55 % inhibition was obtained. This value is comparable with that obtained by Woo *et al*. (2010), who reported values of around 95% inhibition in *C. bipinnatus* extracts obtained by ultrasound using the DPPH method. These authors reported high instability of the extracts after 12 d. The extracts lost approximately 50 % of their antioxidant capacity. The data are also comparable with those reported by Cheng *et al*. (2016), who reported values of 80 and 89 % inhibition in *Cosmos caudata* extracts obtained with methanol and ethanol respectively, determined by the ABTS method. It is worth mentioning that, although cyanidins are reported as the main anthocyanins responsible for the biological activities of the *C. bipinnatus* violet variety, including the antioxidant and antimutagenic capacity (Oh *et al*., 2008), a relationship cannot be established with a direct relationship between the amount of cyanidins and the antioxidant capacity due to the large amount of additional compounds found in this flower (Jang *et al*., 2008).

Due to the instability that anthocyanins present in the face of various factors, mainly light, pH, and temperature, it is essential to use a protection method, being encapsulation a very good option. There are many encapsulation techniques for plant pigments, but due to the thermosensitivity of anthocyanins, in this work, the use of encapsulation by lyophilization was chosen.

Microencapsulation of plant pigment

In microencapsulation by lyophilization, two wall materials were tested: M and GA, and their mixture at a 1:1 ratio. In all three cases, the encapsulation of the pigment was achieved, obtaining three powders with light purple tones. At first glance, the tone obtained by using M alone as wall material seemed a little more intense, as shown in Figure 2.

Analysis of the microencapsules

Several determinations were carried out on the microencapsules obtained to find out if the wall material used had any effect on the encapsulation process (Table 3).

Encapsulation performance

Although the encapsulation performance values using different wall materials were slightly different (89.27 ± 0.17, 87.14 ± 1.71, and 88.36 ± 1.03 for M, GA, and M-GA respectively), no significant differences were found between any of the values obtained. This indicates that the amount of solids encapsulated during freeze-drying is similar regardless of the wall material used. It is worth mentioning that the values obtained (close to 90 %) are comparable with other encapsulation performance values reported using this same method (Kaderides, 2015; Sharayei *et al*., 2020).



Figure 2. PPCb encapsulated by freeze-drying. a) Using M as wall material; b) Using GA as wall material; c) Using M-GA in a 1:1 ratio (M-GA) as a wall material.
Figura 2. PPCb encapsulado por liofilización. a) Usando M como material de pared. b) Usando GA como material de pared. c) Usando M-GA en proporción 1:1 (M-GA) como material de pared.

Tabla 3. Análisis de los microencapsulados
Table 3. Analysis of microencapsulates.

Parameters	Wall material		
	M	GA	M-GA
Encapsulation performance (% w/w)	89.27 ± 0.17[a]	87.14 ± 1.71[a]	88.36 1.03[a]
Apparent density (g/mL)	0.323 ± 0.015[a]	0.276 ± 0.018[a]	0.174 0.026[b]
Humidity (%)	0.92 ± 0.15[a]	2.50 ± 0.35[b]	1.13 0.21[a]
Microencapsulation efficiency (%)	81.51 ± 3.74[a]	82.64 0.99[a]	80.62 ± 5.09[a]

Results are expressed as mean ± standard deviation of triplicate measurements. Values in the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Determination of moisture content

In the determinations of the moisture content, it was found that the microencapsulate that retained the most moisture was the one that used GA, with a value of 2.50 ± 0.35, being significantly higher than the humidity of the encapsulates where GA and M-GA were used as wall materials, this is consistent with what was reported by Stoll *et al*. (2016), who, using the same formulations in the same proportions, obtained the highest humidity percentages in the formulation with GA, followed by the mixture between both wall materials and M alone. However, the humidity percentages obtained by these authors were higher, being 12.54 % for GA, 11.61 % for the M-GA formulation, and 10.65 % for M; this is because, in their study, the lyophilization of the material to be encapsulated was carried out only once, while in this study two lyophilization sessions were carried out, leaving the capsules with a lower percentage of humidity. This low moisture content is somewhat beneficial, since a high moisture content promotes molecular movement, increasing chemical reactions and degradation, and decreasing the stability of the molecules (Jafari *et al*., 2016).

Apparent density

The density results obtained for the microencapsulates are similar to those reported by Kaderides *et al*. (2015), who used GA, M, and two other wall materials, alone and in combinations, obtaining values of 0.13 to 0.74 g/mL. The microencapsulation obtained using M-GA was the one that presented the lowest value compared to the other wall materials. This decrease in apparent density may be due to the interaction between the materials when mixed, as reported by Rowe *et al*. (2009). The polysaccharides when processed together, can modify their structures resulting in a less dense component compared to when they are alone. It is worth mentioning that the density of the microencapsulates is provided by the wall materials, which could give them greater or lesser volume. Furthermore, at the time of release, they could modify the characteristics of the encapsulated pigment, potentially making it more or less viscous or with different colors than desired.

Microencapsulation efficiency

The efficiency of microencapsulation is directly related to the lifetime of anthocyanins in the powder (Idham *et al*., 2012), which refers to the potential of the wall material to encapsulate or maintain a material within the microcapsule. The efficiency of the three encapsulations obtained remained close to 80% and there was no significant difference between them, indicating that most of the components are found within the microcapsules. Various authors have compared the use of M y GA as wall materials for the production of microcapsules (Stoll *et al*., 2016; Idham *et al*., 2012; Silva *et al*., 2013; Souza *et al*., 2015), without definitive conclusions as to which is better as an encapsulant. In this work, similar results to those reported were obtained, since no significant differences were found in the encapsulation efficiency between the wall materials used or in their combination, this is because the two materials used have similar characteristics. It has been reported that it is the encapsulant material-encapsulated material ratio that affects the encapsulation characteristics, as well as the microencapsulation efficiency (Mahdavi *et al*., 2016), in this study when used the same proportions with no variation in the encapsulation efficiency.

Scanning electron microscopy

According to Cam *et al*. (2014), the surface morphology of microencapsulates is an indicator of the quality of the encapsulation and in turn, is related to the physicochemical properties of the capsules such as fluidity and dispersibility. Figure 3 shows the micrographs of the encapsulations with the two wall materials and their combination, showing that

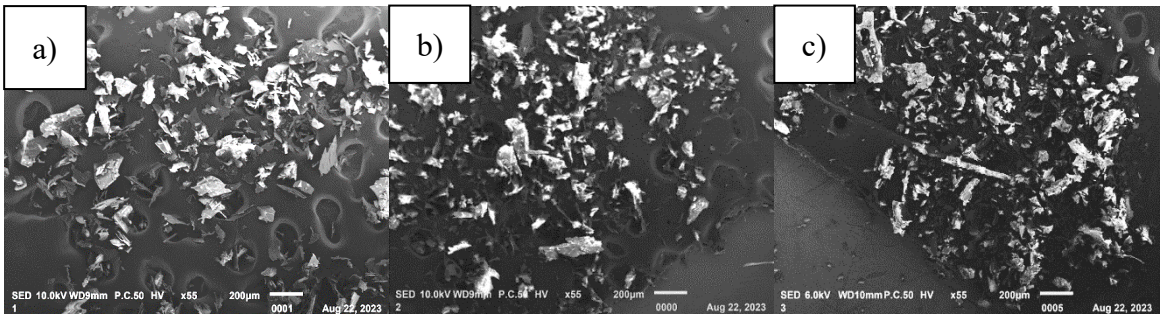


Figure 3. Microstructure of encapsulated PPCb, using different wall materials. a) M, b) GA, c) M-GA.
Figura 3. Microstructura de PPCb encapsulado, usando diferentes materiales de pared. a) M, b) GA, c) M-GA.

they all have an irregular shape similar to broken glass, which reflects the presence of the wall materials on the surface of the encapsulation, indicating that the pigments are trapped; similar results were reported by several authors who used the same encapsulation method (Pudziuvelyte *et al*., 2020; Thakur *et al*., 2020; Sun *et al*., 2022). This morphology is considered typical of the lyophilization encapsulation process (Khazaei *et al*., 2014). All microencapsules have smooth surfaces and similar particle sizes. No obvious difference is observed when using the wall materials separately or their combination.

Release kinetics

The release kinetics of the three encapsulates were determined in an aqueous system at room temperature (25 ± 1 °C), measuring the anthocyanin content, as well as the color, every 5 minutes for one hour. It was observed that the microencapsulate containing M-GA was the one that presented the best characteristics since the release of anthocyanins was carried out in a more controlled manner and the color was maintained better (data not shown). Based on the above, microencapsulation with M-GA was chosen for subsequent tests, which consisted of carrying out release kinetics at common temperatures used in the food industry. Considering the refrigeration temperature (4 °C), the ambient temperature (25 °C) and a common food process temperature (65 °C).

During the release kinetics, total phenolics, antioxidant capacity, and anthocyanins were quantified and color was measured.

Quantification of total phenols

Phenols are of utmost importance in plants, they fulfill various functions within the plant as protection against stress, and they participate significantly in the regulation of the plant in the face of a large amount of light, low temperatures, infections by pathogens, herbivores, and deficiency of nutrients (Naikoo *et al*., 2019). In the food industry, they are desired because they provide color, and flavor and act as antioxidants (López *et al*., 2023). During industrial processes they are subjected to various conditions, such as abrupt changes in temperature that can cause changes in their structure, affecting their stability and availability. In the release kinetics, it was observed that the concentration and release rate of phenols to the medium is higher at 25 °C and 65 °C without significant differences between them (Figure 4), compared to the release at 4 °C. These results coincide with those reported by Acosta *et al*. (2014), who tested different extraction conditions of phenols from plant matter, and concluded that these compounds are obtained better by increasing the temperature; these authors obtained higher concentrations of phenols in treatments with temperatures higher than the environment. This may be because by increasing temperature there is a better disruption of the molecules that retain phenols, achieving better release rates (Wang *et al*., 2014).

Quantification of anthocyanins

The release of anthocyanins, on the other hand, was affected at 65°C, where the percentage of release at the end of the

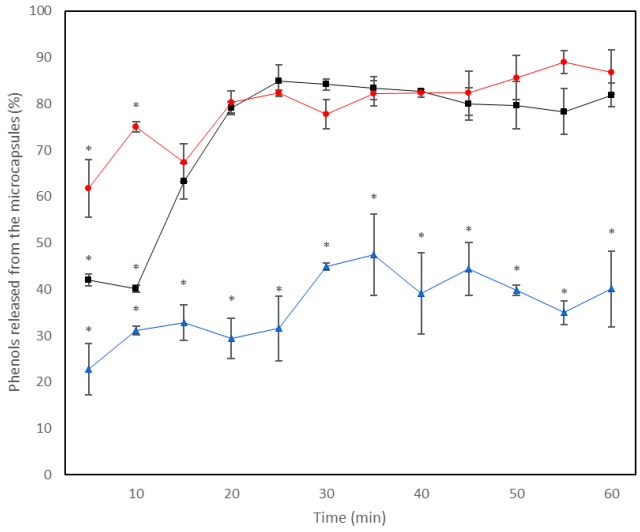


Figure 4. Release kinetics of total phenols from microencapsulates, using GA-M as wall material, evaluated at different temperatures. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.

Figura 4. Cinética de liberación de fenoles totales a partir del microencapsulado, usando GA-M como material de pared, evaluado a diferentes temperaturas. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.

kinetics was significantly lower compared to the other two temperatures (4 and 25 °C) (Figure 5). Something notable is that the release of anthocyanins at 65 °C is faster compared to the other two temperatures. It can be seen that there is an increase until minute 20 and from that point onwards a slight decrease in the percentages released begins. This behavior was also reported by Jiang *et al*. (2019) and Alburquerque *et al*. (2020), who tested different temperature conditions and exposure times for the extraction treatment, concluding that the longer the exposure time to high temperatures, a lower concentration of anthocyanins will be obtained, indicating possible thermal degradation. Albuquerque *et al*. (2020) concluded that the best temperature and exposure time

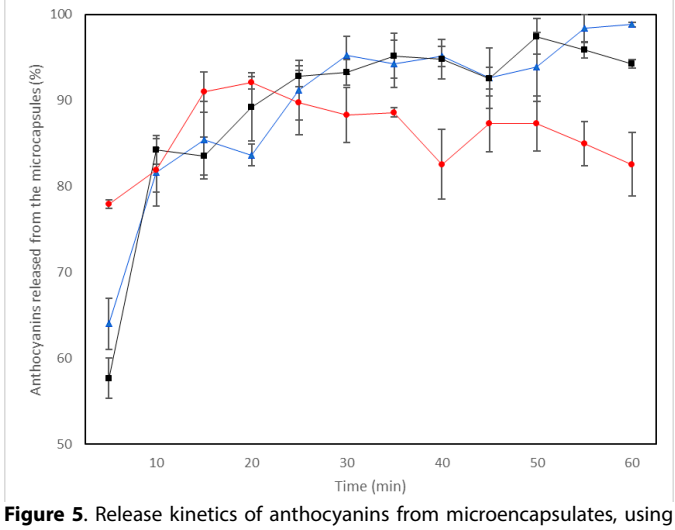


Figure 5. Release kinetics of anthocyanins from microencapsulates, using GA-M as wall material, evaluated at different temperatures. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.

Figura 5. Cinética de liberación de antocianinas a partir del microencapsulado, usando GA-M como material de pared, evaluado a diferentes temperaturas. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.

conditions for the extraction of anthocyanins were 34.4°C for 9 minutes and that at higher values there was a decrease in the extracted anthocyanins.

Determination of antioxidant capacity

Compounds with antioxidant capacity are also considered of utmost importance in food products since they not only have benefits for human health, but also influence the preservation of food by inhibiting oxidative processes, which cause instability, loss of flavor, color, and other desirable characteristics (Shahidi *et al*., 2015). That is why they seek to preserve throughout the entire food production process, where various temperatures are generally involved.

Regarding the antioxidant capacity, this was not affected by temperature (Figure 6). Except for the first point of the kinetics, the antioxidant capacity showed similar behavior in the three temperature conditions. This could be because the compounds released at the three temperatures have good antioxidant capacities, while at 4 °C and 25 °C a higher percentage of anthocyanins are being released, which are associated with the antioxidant capacity (Wu *et al.,* 2018), at 65°C a higher percentage of phenols is being released, which are also directly related to the antioxidant capacity (Bijani *et al*., 2021), thus compensating for the lower percentage of anthocyanin release that occurs at high temperatures, and obtaining kinetics of release similar to the three temperatures evaluated.

Color comparison of M-GA at three temperatures

Regarding the color during the release kinetics (Table 4), the most affected values were those of luminosity (L*) and red intensity (+a*) at 65 °C. From the beginning, the release kinetics at 65 °C were the ones that presented the highest L* values and the lowest intensity values of the red hue; this

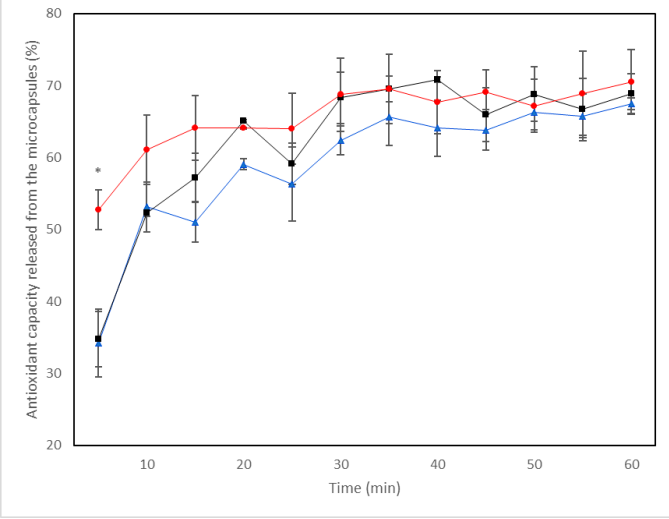


Figure 6. Release kinetics of antioxidant capacity from microencapsulates, using GA-M as wall material, evaluated at different temperatures. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.
Figura 6. Cinética de liberación de capacidad antioxidante a partir del microencapsulado, usando GA-M como material de pared, evaluado a diferentes temperaturas. (▲) 4 °C, (■) 25 °C and (●) 65 °C.

Tabla 4. Color del pigmento liberado a diferentes temperaturas a partir de los microencapsulados, usando GA-M como material de pared.
Table 4. Pigment color released at different temperatures from the microencapsulated, using GA-M as wall material.

Parameters	Release temperature		
	4°C	25°C	65°C
Luminosity (L*)	20.18 ± 0.62	19.23 ± 0.35	24.82 ± 0.89
Coordinate a*	23.94 ± 0.48	24.87 ± 0.24	20.07 ± 0.63
Coordinate b*	1.08 ± 0.32	1.49 ± 0.24	-0.02 ± 0.48

Results are expressed as mean ± standard deviation of triplicate measurement.

may be due to the low percentage of anthocyanins released at such temperature. The behavior of the L* and a* variables is characteristic of a decrease in the amount of anthocyanins, which was reported by Jiang *et al*. (2019), who concluded that the increase in temperature causes anthocyanins to drastically change color, causing an increase in brown tones, and an irreversible decrease in the red tone, in addition to an increase in L*, probably due to a process of degradation.

However, in this work, the time and temperature conditions were not sufficient for the red hue of the sample to be completely lost. A decrease was obtained at 65°C, but it was not completely lost. This can be explained because anthocyanins have certain heat resistance and good color stability at acidic pH (Wu *et al*., 2018). It is worth mentioning that the pH of the plant pigment presented values between 4 and 5, with pH being the main factor that influences the coloration of anthocyanins. The values of the variable b* presented small changes that cannot be seen with the naked eye.

Since anthocyanins are the main responsibles for the color in the plant pigment, they are the priority to preserve with microencapsulation, seeking to preserve their color and antioxidant capacity, therefore, the best temperature conditions to release the extracts are 4°C and 25°C given that it is where these attributes are best preserved.

CONCLUSIONS

Hydroalcoholic extraction allows obtaining dye extracts from *C. bipinnatus* flower petals with a phytochemical composition abundant mainly in phenols and anthocyanins, which provide antioxidant capacity. These properties in turn make it prone to degradation, so it is necessary to implement an encapsulation method to guarantee its protection.

Encapsulation by freeze-drying of the plant pigment presents good encapsulation performance and efficiency, so we can say that it is a suitable and efficient method to encapsulate this type of material. On the other hand, the combination of GA and M as wall materials are good options because they favor the conservation of the physicochemical properties of the plant extract.

With the encapsulation method and the wall materials used, the best temperature conditions for the conservation of anthocyanins, and as a consequence the antioxidant capacity and color of the plant pigment, are 4 and 25°C.

Based on the results obtained, we can conclude that the plant pigment extracted from the petals of *C. bipinnatus* and encapsulated by freeze-drying can be considered a potential source of plant pigment with application in the food industry, especially in products that do not require temperatures higher than 25 °C.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the partial financial support of the Autonomous University of the State of Mexico under Grant Agreement No. 4989/2020CIB.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that does not exist an interest conflict.

REFERENCES

Acosta, B., Gutiérrez, J., and Serna, S. 2014. Bound phenolics in foods, a review. Food chemistry. 152: 46-55.

Albuquerque, B.R., Pinela, J., Barros, L., Oliveira, M.B.P., and Ferreira, I.C. 2020. Anthocyanin-rich extract of jabuticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat-and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. Food Chemistry. 316: 126364.

Arzola, S. 2021. Chalconas, bioactividad y aplicaciones sintéticas. Universidad de la Laguna.

Baite, T.N., Mandal, B., and Purkait, M.K. 2021. Ultrasound-assisted extraction of gallic acid from *Ficus auriculata* leaves using a green solvent. Food and Bioproducts Processing. 128: 1-11.

Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A., and Mussatto, S.I. 2017. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. Food Chemistry. 237: 623-631.

Bhuiyan, M.N.I., and Nahid, M. 2023. Comparison of the chemical composition and antimicrobial activity of two types of cosmos (*Cosmos bipinnatus* Cav. and *Bidens ferulifolia* (Jacq.)) leaf essential oils introduced in Bangladesh. Journal of Chromatography and Separation Techniques. 14:515.

Bijani, S., Gharari, Z., Ahmadnia, A., Danafar, H., and Sharafi, A. 2021. A comparative study of apigenin content and antioxidant potential of *Cosmos Bipinnatus* transgenic root culture. Pharmaceutical and Biomedical Research. 7(2):87-96.

Cam, M., Icyer, N., and Erdogan, F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and ingredient for functional food development. LWT- Food Science and Technology. 55:117-123.

Cheng, S.H., Khoo, H.E., Ismail, A., Abdul-Hamid, A., and Barakatun-Nisak, M.Y. 2016. Influence of extraction solvents on *Cosmos caudatus* leaf antioxidant properties. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science. 40: 51-58.

da Silva Luna, V., Randau, K.P., Ferreira, M.R.A., and Soares, L.A.L. 2022. Development and validation of analytical method by spectrophotometry UV-Vis for quantification of flavonoids in leaves of *Senna occidentalis* Link. Research, Society and Development. 11(1): e14411118584-e14411118584.

da Silva Júnior, M.E., Araújo, M.V.R.L., Martins, A.C.S., dos Santos Lima, M., da Silva, F.L.H., Converti, A., and Maciel, M.I.S. 2023. Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. Scientific Reports. 13(1):15222.

Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J., Malheiro, R., Rodrigues, N., Saraiva, J., and Ramalhosa, E. 2019. Borage, calendula, cosmos, Johnny Jump up, and pansy flowers: volatiles, bioactive compounds, and sensory perception. European Food Research and Technology. 245: 593-606.

Fernández-López, J.A., Fernández-Lledó, V., and Angosto, J.M. 2020. New insights into red plant pigments: More than just natural colorants. RSC Advances. 10(41): 24669-24682.

Ghosh, S., Sarkar, T., Das, A., and Chakraborty, R. 2022. Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. Food Science and Technology. 153:112527.

Gutiérrez, F.G., Simental, S.S., Tenorio, R.G., and Martínez, M.A. 2023. Efecto de hidrolato de *Cosmos bipinnatus* sobre características de textura, color y actividad de agua de chorizo de conejo. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 8(1):418-423.

Idham, Z., Muhamad, I., and Sarmidi, M. 2012. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa L*. Journal of Food Process Engineering. 35(4): 522-542.

Iwashina, T. 2015. Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. Natural Product Communications. 10(3):1934578X1501000335.

Jafari, S., Mahdavi-Khazaei, K., and Hemmati-Kakhki, A. 2016. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. Carbohydrate Polymers. 140.20-25.

Jang, I., Park, J. Park, E., Park, H., and Lee, S. 2008. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers. Plant Foods for Human Nutrition. 63: 205-210.

Jiang, X., Guan, Q., Feng, M., Wang, M., Yan, N., Wang M., and Gui, Z. 2019. Preparation and pH controlled release of Fe3O4/ anthocyanin magnetic biocomposites. Polymers. 11(12): 2077.

Jurić, S., Jurić, M., Król-Kilińska, Ż., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M., Dragović-Uzelac, V., and Donsì, F. 2022. Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods. Food Reviews International. 38(8):1735-1790.

Kaderides, K., Goula, A., and Adamopoulos, K. 2015. A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. Innovative Food Science & Emerging Technologies.31:204-215.

Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M., and Kakhki, A.H. 2014. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. Carbohydrate polymers.105:57-62.

Konica Minolta, 2023. Entendiendo el espacio de color CIE L*A*B*. https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/, Toluca, México, (Consultado june 6, 2023).

Kulichenko, E.O., Andreeva, O.A., Sergeeva, E.O., Sigareva, S.S., Terekhov, A.Y., Oganesyan, E.T., and Sidorskaya, S.Y. 2022. Pharmacological activity of extracts from plants of *Cosmos bipinnatus* Cav. species. Pharmacy & Pharmacology. 10(1):82-92.

Ladeska, V., Elya, B., and Hanafi, M. 2022. Antioxidants, total phenolic and flavonoid content and toxicity assay of ampelas (*Tetracera macrophylla* Wall. Ex Hook. F. & Thoms) From Kalimantan-Indonesia. Pharmacognosy Journal.14(5).

López, R., Sandoval, T., and Iñiguez, M. 2023. Plant pigments: classification, extraction, and challenge of their application in the food industry. Food Bioprocess Technology. 1-17.

Mahdavi, S. Jafari, S. Assadpoor, E., and Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. International Journal of Biological Macromolecules. 85:379-385.

Menegazzi, G.D.S., Teixeira, E.C., Pinto, L.A.D.A., and Burkert, J.F.D.M. 2020. Spray-drying microencapsulation of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma*. Industrial Biotechnology. 16(5):300-308.

Mota, I.G.C., Neves, R.A.M.D., Nascimento, S.S.D.C., Maciel, B.L.L., Morais, A.H.D.A., and Passos, T.S. 2023. Artificial dyes: Health risks and the need for revision of international regulations. Food Reviews International, 39(3), 1578-1593.

Naikoo, M.I., Dar, M.I., Raghib, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., ... and Naushin, F. 2019. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. Plant Signaling Molecules. 157-168.

Nambela, L. 2023. The potentials of plant-based colorants for sustainable textile dyeing industry. Research Journal of Textile and Apparel. Vol. ahead-of-print No. ahead-of-print. https://doi.org/10.1108/RJTA-04-2023-0043

Nguyen H. L., and Bechtold T. 2021. Thermal stability of natural dye lakes from Canadian Goldenrod and onion peel as sustainable pigments. Journal of Cleaner Production, 315, 128195.

Ninama, V., Shah, H., Kapadia, C., Italiya, A., Datta, R., Singh, S., and Singh, A. 2024. Assessment of phytochemicals, nutritional compositions and metabolite profiling using GCMS–from annual edible flowers. Scientia Horticulturae, 323, 112551.

Oh, W.G., Jang, I.C., Jeon, G.I., Park, E.J., Park, H.R., and Lee, S.C. 2008. Antioxidative activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 37(6), 677-683.

Orozco-Villafuerte, J., Escobar-Rojas, A., Buendía-González, L., García-Morales, C., Hernandez-Jaimes, C., and Alvarez-Ramirez, J. 2018. Evaluation of the protection and release rate of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) extracts encapsulated in alginate beads. Journal of Dispersion Science and Technology.

Pasdaran, A., Zare, M., Hamedi, A., and Hamedi, A. 2023. A review of the chemistry and biological activities of natural colorants, dyes, and pigments: challenges, and opportunities for food, cosmetics, and pharmaceutical application. Chemistry & Biodiversity. 20(8): e202300561.

Piñón-Balderrama, C.I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., and Saavedra-Leos, M.Z. 2020. Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. Processes. 8(8):889.

Pudziuvelyte, L., Marksa, M., Sosnowska, K., Winnicka, K., Morkuniene, R., and Bernatoniene, J. 2020. Freeze-drying technique for microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* ethanolic extract using different coating materials. Molecules. *25*(9):2237.

Rodríguez-Mena, A., Ochoa-Martínez, L.A., González-Herrera, S.M., Rutiaga-Quiñones, O.M., González-Laredo, R.F., and Olmedilla-Alonso, B. 2023. Natural pigments of plant origin: Classification, extraction and application in foods. Food Chemistry. 398:133908.

Rowe, R. Sheskey, P. and Quinn, M. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.

Sethi, S., Joshi, A., Arora, B., Bhowmik, A., Sharma, R.R., and Kumar, P. 2020. Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC assays for antioxidant activity determination in apple fruit extracts. European Food Research and Technology. 246:591-598.

Shahidi, F., and Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods. 18:757-781.

Sharayei, P., Azarpazhooh, E., and Ramaswamy, H.S. 2020. Effect of microencapsulation on antioxidant and antifungal properties of aqueous extract of pomegranate peel. Journal of food science and technology. 57(2):723-733.

Silva, P., Stringheta, P., Teófilo, R., and De Oliveira, I. 2013. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. Journal of Food Engineering. 117(4):538-544.

Souza, V. Thomazini M., de Carvalho Balieiro J., and Fávaro-Trindade, C. 2015. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). Food and Bioproducts Processing. 93:39-50.

Stoll, L., Costa, T.M.H., Jablonski, A., Flôres, S.H., and de Oliveira Rios, A. 2016. Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable film. Food and bioprocess technology. 9:172-181.

Sun, W., Nguyen, Q.D., Sipiczki, G., Ziane, S.R., Hristovski, K., Friedrich, L., and Bujna, E. 2022. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v Strain with whey proteins by lyophilization and its application in production of probiotic apple juices. Applied Sciences.13(1):318.

Thakur, N.S., and Thakur, A. 2020. Microencapsulation of wild pomegranate flavedo phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. Food Science and Technology. 133:110077.

Wang, T. He, F. and Chen, G. 2014. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. Journal of Functional Foods. 7:101-111.

Woo. J.H., Shin, S.L., Chang, Y.D., and Lee, C.H. 2010. Antioxidant effect according to extraction method in extracts of *Dendranthema zawadskii* var. yezoense and *Cosmos bipinnatus*. Horticultural Science & Technology. 28(3):462-468.

Wrolstad, R.E., Durst, R.W., and Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends in Food Science & Technology.16(9):423-428.

Wu Y., Yang K.M., and Chiang P.Y. 2018. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. Molecules. 23(6):1357.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

In vitro and in silico antioxidant and antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Cnidoscolus chayamansa* leaves

Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro e in silico de extractos etanólicos de hojas de *Cnidoscolus chayamansa*

Karla Y. Posada-Mayorga[1], Jorge Carlos Ruíz-Ruíz[2], Zendy Evelyn Olivo-Vidal[1], Carlos Alberto Lobato-Tapia[3], Neith Aracely Pacheco-López[4], Iván Emanuel Herrera-Pool[4], Cesar A. Irecta-Najera[1], and Xariss M. Sánchez-Chino[5]*

[1] Departamento de Salud, El Colegio de la Frontera Sur-Villahermosa. Carretera a Reforma Km. 15.5 s/n. Ra. Guineo 2da. Sección, Villahermosa, C.P. 86280, Tabasco, México.
[2] Escuela de Nutrición, Universidad Anáhuac Mayab. Carr. Mérida Progreso Km. 15.5. 96 Cordemex, CP. 97310, Mérida, Yucatán, México.
[3] Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla, Popocatépetl s/n, Reserva Territorial Atlixcáyotl, Tres Cerritos, 72480 Puebla, Pue., México.
[4] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Km 5.5 ca-rretera, Sierra Papacal - Chuburná, C.P. 97302, Chuburná, Yucatán.
[5] CONAHCYT-Departamento de Salud, El Colegio de la Frontera Sur-Villahermosa. Carretera a Reforma Km. 15.5 s/n. Ra. Guineo 2da. Sección, Villahermosa, C.P. 86280, Tabasco.

ABSTRACT

Cnidoscolus chayamansa leaves – used in gastronomy and traditional medicine in Mexico – are rich in phenolic compounds, which may have antioxidant and antimicrobial activity. In this study we evaluated the *in vitro* antioxidant activity and *in silico* antibacterial activity, of ethanolic extracts of *C. chayamansa* leaves obtained by ultrasonication. Phenolic content was 14.37 mg GAE/mL. Guanosine nucleoside and coumaric acid, and kaempferol derivatives were identified through UPLC-PDA-ESI-MS. Evidence of antioxidant activity was demonstrated by the Cu^{2+} chelation activity (65.53 %) and the Fe^{3+} reducing antioxidant power (69.59 %). Although no antibacterial activity was found against *E. coli* and *S. aureus*, the *in silico* analysis revealed that the isolated phenolic compounds modify signaling pathways essential for the survival of the bacteria studied.

Keywords: chaya leaves; phenolic compounds; molecular docking; antioxidant activity; antibacterial activity.

RESUMEN

Las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* – utilizadas en la gastronomía y la medicina tradicional en México – son ricas en compuestos fenólicos que pueden tener actividad antioxidante y antimicrobiana. En este estudio evaluamos la actividad antioxidante *in vitro* y la actividad antibacteriana *in silico* de extractos etanólicos de hojas de *C. chayamansa* obtenidos por ultrasonicación. El contenido de compuestos fenólicos fue de 14.37 mg GAE mL^{-1}. Se lograron identificar compuestos como nucleósido de guanosina, ácido cumárico y los derivados de kaempferol mediante UPLC-PDA-ESI-MS. Los extractos tuvieron actividad antioxidante por medio de la quelación del Cu^{2+} (65.53 %) y el poder reductor del Fe^{3+} (69.59 %). Aunque no se encontró actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*, por medio de la inhibición de crecimiento en disco, el análisis *in silico* reveló que los compuestos fenólicos aislados modifican las vías de señalización esenciales para la supervivencia de las bacterias estudiadas.

Palabras clave: hojas de chaya; compuestos fenólicos; docking molecular; actividad antioxidante; actividad antibacteriana.

INTRODUCTION

Cnidoscolus chayamansa, commonly known as *chaya* is an endemic shrub of Tabasco and the Yucatan Peninsula in Mexico (Pérez-González *et al*., 2019) used in local gastronomy, in addition to traditional medicine (Rodrigues *et al*., 2021) presumably due to a high content of bioactive compounds (phenols, flavonoids, coumarins, and cyanogenic glycosides) in its leaves (Gutiérrez-Rebolledo *et al*., 2016; Bautista-Robles *et al*., 2020). The antioxidant activity of bioactive compounds plays a fundamental role through multiple pathways, preventing oxidative stress (OS)-related diseases (Pisoschi *et al*., 2021) such as diabetes mellitus and cardiovascular diseases (scavenging free radicals, increasing the activity of endogenous antioxidant enzymes, improvement of insulin resistance and enhancement of glucose uptake and metabolism) (Huang *et al*., 2020; Garcia and Blesso, 2021), as well as cancer, they induce apoptosis, by lowering the nucleoside diphosphate kinase-B activity (involved in nucleic acid replication), inhibiting cell-proliferation and cell cycle arrest by suppressing the NF-kB pathway in various cancers (Hazafa *et al*., 2020).

OS occurs when reactive oxygen species (ROS) and free radicals (FR) increase, which may cause cellular and tissue damage (Ouadi *et al*., 2017). Bioactive compounds such as polyphenols may act as antioxidants, anti-inflammatory, and antimicrobial agents through modulation of inhibitory re-

*Author for correspondence: ariss M. Sánchez-Chino
e-mail: xsanchez@ecosur.mx
Received: January 17, 2024
Accepted: March 21, 2024
Published: May 10, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2233

ceptors of inflammation and activators of anti-inflammatory enzymes (Kaabi, 2022).

A positive correlation exists between the content of phenolic compounds and the antibacterial capacity, including bacteriostatic and bactericidal properties. Phenolic compounds modify the bacterial cytoplasmic membrane permeability and inhibit signaling pathways involved in bacterial survival (Vazquez-Armenta *et al*., 2022). Research shows that ethanolic extracts of *C. chayamansa* leaves showed high antibacterial activity against *S. aureus*, *B. Cereus*, *E. coli*, *K. pneumo*niae and *S. pyogenes* (Elizabeth *et al*., 2023). Moreover, the extraction method can affect the concentration of phenolic compounds; for instance, modern extraction methods based on sonication – generated through the coupling of high-power and low-frequency ultrasound waves that travel through the liquid medium, causing cycles of low and high-pressure and creating acoustic cavitation bubbles that collapse releasing a large number of compounds present in the sample (Chemat *et al*., 2017; Fu *et al*., 2020). The current study aimed to evaluate the *in vitro* and *in silico* antioxidant and antibacterial potential of the Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE) of *C. chayamansa* leaves.

MATERIALS AND METHODS

Collection and preparation of samples. Leaves of *C. chayamansa* were collected on February 2022, from the edge of the Teapa River (17°33'49.3"N 92°57'09.7"W), Joyas del Pedregal, in the municipality of Teapa, Tabasco, Mexico, and studied in the herbarium from El Colegio de la Frontera Sur (code HET 2459, HET 2460, and HET 2461). Leaves were washed with drinking water, dried in a dehydrator (Model 32 100, Hamilton Beach) at a constant temperature of 41 ºC for 18 hours, and grounded until pulverized.

Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE)

The ethanolic extraction comprised 10 g of dry leaves of *C. chayamansa* in 100 mL of aqueous ethanol (1:1) using a 40 kHz ultrasonic mechanical bath (1800, Branson, St. Louis, MO, USA) at 25 °C for 30 min. The extracts were filtered through Whatman #1 paper (150 mm diameter) and stored at 4 °C (Pérez-González *et al*., 2019).

Quantification and profile of phenolic compounds from Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE)

The Folin-Ciocalteu method (Ruiz *et al*., 2015) was used to estimate the concentration of phenolic compounds from *C. chayamansa*, with gallic acid as the standard (≥ 98.0, CAS: 5995-86-8, Fermont, Monterrey, Mexico). The analyses were carried out in triplicate, and results are expressed as mg of Gallic Acid Equivalents (mg GAE/mL).

The profile of phenolic compounds from Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE) of *C. chayamansa* was determined through ultra-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector and electrospray ionization mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI-MS); using an ultra-performance liquid chromatograph (UPLC) (ACQUITY UPLC H-Class, Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with a quaternary pump (UPQSM), and an automatic injector (UPPDALTC). Chromatographic separation was performed on a Waters' ACQUITY UPLC BEH C18 column, 1.7 µm, 100 x 2.1 mm I.D (Milford, MA, USA) under similar conditions reported by Herrera-Pool *et al*. (2021). The Photodiode Array Detector (PDA) was set to scan within a wavelength (λ) range from 190 nm to 600 nm. The absorbance response was taken from channels A (290 nm) and B (350 nm). Mass spectra (Xevo TQ-S Micro, Waters, Chicago, IL, USA) were recorded in full scan negative ion mode at 50 - 2000 m/z. Compounds were identified by comparing the observed spectral fingerprint data with those reported in Pubchem and MassBank databases.

Determination of antioxidant activities *in vitro*

Chelating capacity of Cu^{2+} and Fe^{2+} *in vitro*

Chelating activity of Cu^{2+} was determined with the method reported by Saiga *et al*. (2003), mixing 250 µL of sodium acetate buffer (50 mM, pH 6.0) with 250 µL of 20 mM Cu^{2+} standard solution and 25 µL of 0.1 % violet pyrocatechol, reacted for 5 min at 25 ºC and then 250 µL of the blank (distilled water) or UAEE samples were added. The absorbances were measured at 632 nm in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA). All samples were performed in triplicate. The copper chelating activity was calculated as:

$$\%\ CC\ Cu^{2+} = (Sampler\ Abs - Blank\ Abs)/(Sampler\ Abs)\times 100 \quad \text{(Eq 1)}$$

Where % CC Cu^{2+} represents the percentage of copper chelated.

The Fe^{2+} chelating capacity was determined by the method used by Ruiz *et al*. (2015). Briefly, the absorbance of a blank and the UAEE samples were read, mixing 250 µL of sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.9) with 250 µL of 20 mM Fe^{2+} standard solution, and 250 µL of water (in the case of the blank) or 250 µL of UAEE. Next, it was left to react for 5 min at room temperature and then 50 µL of 40 mM ferroxine solution were added. Absorbances were measured at 562 nm in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA). All samples were processed in triplicate. The Fe^{2+} chelating activity is estimated as shown in Eq. 2:

$$\%\ CC\ Fe^{2+} = (Sampler\ Abs-Blank\ Abs)/(Blank\ Abs)\times 100 \quad \text{(Eq 2)}$$

Where % CC Fe^{2+} represents the percentage chelating capacity.

Fe^{3+} reducing power

The Fe^{3+} reducing power was determined using the method described by Sudha *et al*. (2011). Briefly, absorbance measurements from a blank (distilled water) and UAEE were made. 250 µL of blank or sample were taken and 250 µL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 250 µL of 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$ were added in each case, shaken for 5 sec in a vortex and

incubated at 50 ºC for 20 min. Once the incubation was completed, 250 µL of 10 % $C_2HCl_3O_2$ was added, 500 µL of this mixture was taken and deposited in a 2 mL Eppendorf tube, and then 400 µL of distilled water and 100 µL of 0.1% $FeCl_3$ were added, mixed for 5 seconds in a vortex and incubated at 50 ºC for 10 minutes. Finally, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min in a centrifuge with a 10 cm rotor diameter (J-40, Solbat. Edo. Mex., Mexico), and the absorbances of the supernatant were read at 700 nm in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA). All samples were analyzed in triplicate. The Fe^{3+} reducing power was estimated as shown in Eq 3:

$$\% \text{ PR } Fe^{2+} = (\text{Sampler Abs-Blank Abs})/(\text{Sampler Abs}) \times 100 \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where % PR Fe^{2+} represents the percentage reducing power of Fe^{3+}.

ABTS radical scavenging capacity

ABTS radical scavenging capacity was determined by the method reported by Ruiz *et al*. (2015) with some modifications. First, a 2.0 mM ABTS solution was prepared, then the $ABTS^+$ radical cation was produced with a 70 mM $K_2S_2O_8$ solution, allowing the mixture to remain in the dark at 25 ºC for 16 hours before use. Subsequently, this solution was diluted with phosphate buffer (1.0 M, pH 7.4) until obtaining an absorbance of 0.800 ± 0.030 at 734 nm. Next, 10 µL of UAEE diluted 1:10 were taken and reacted with 990 µL of the $ABTS^+$ radical diluted in phosphate buffer. Next, the absorbance at 734 nm was measured in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA) after 1 and 6 min of reaction. The same procedure was performed with a blank sample using 50% ethanol. All samples were analyzed in triplicate. The $ABTS^+$ radical scavenging percentage (% RS) of the samples were calculated as shown in Eq. 4:

$$\% \text{ RS} = (\text{Sampler Abs-Blank Abs})/(\text{Sampler Abs}) \times 100 \quad \text{(Eq. 4)}$$

Where % RS represents the percentage ABTS radical scavenging.

DPPH radical scavenging capacity

The DPPH radical scavenging capacity was done according to the method proposed by Fukumoto and Mazza (2000), with some modifications. Briefly, a 0.1 mM DPPH solution in ethanol was prepared. UAEE samples diluted 1:10 and distilled water (as a blank) were analyzed. The procedure was the same for both. 100 µL of blank and 100 µL of extracts were taken individually and 1000 µL of the DPPH solution were added to each one, then shaked in a vortex for 10 seconds and allowed to react for 30 minutes in the dark. Next, their absorbances were read at 517 nm in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA). All samples were analyzed in triplicate. The % uptake of RL DPPH was determined as shown in Eq. 5:

$$\% \text{ RSC} = (\text{Sampler Abs-Blank Abs})/(\text{Sampler Abs}) \times 100 \quad \text{(Eq. 5)}$$

Where % RSC represents the percentage DPPH radical scavenging capacity.

Fe^{3+} reducing power

The reducing power of Fe^{3+} was determined using the method described by Sudha *et al*. (2011). Briefly, absorbance measurements from a blank (distilled water) and UAEE of *C. chayamansa* were made. 250 µL of blank or sample were taken, mixed with 250 µL of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 250 µL of 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ in each case, shaken for 5 seconds in a vortex and incubated at 50 ºC for 20 minutes. Once the incubation was completed, 250 µL of 10 % $C_2HCl_3O_2$ were added, then 500 µL of this mixture were taken and deposited in a 2 mL Eppendorf tube, 400 µL of distilled water and 100 µL of 0.1% $FeCl_3$ were added, mixed for 5 seconds in a vortex and incubated at 50 ºC for 10 min. Finally, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min in a centrifuge with a 10 cm rotor diameter (J-40, Solbat. Edo. Mex., Mexico, and the absorbances of the supernatant measured read at 700 nm in a spectrophotometer (VE-5100UV, Velab, Pharr, TX, USA). All samples were analyzed in triplicate. The reducing power of Fe^{3+} was estimated as shown in Eq. 3:

$$\% \text{ PR } Fe^{2+} = (\text{Sampler Abs-Blank Abs})/(\text{Sampler Abs}) \times 100 \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where % PR Fe^{2+} represents the percentage reducing power of Fe^{3+}.

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the UAEE of *C. chayamansa* was evaluated against *Escherichia coli* (G- ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (G+ ATCC 25923). The agar disc diffusion method was performed on Muller-Hilton agar (MCD LAB, Cat 7131, Mex), prepared according to the manufacturer's specifications and sterilized in an autoclave at 1.055 Kgf/cm² for 15 min. After that, 30 mL of agar were distributed in Petri dishes which were impregnated with 100 µL per box with the adjusted suspension of each indicator bacteria. Six-mm diameter sterile discs were impregnated with 30 µL of UAEE. As a positive control antibiogram discs were used with amoxicillin and clavulanic acid (AMC) at a concentration of 30 µg/mL. As negative controls, disks impregnated with 30 µL of sterilized water were used. All samples were analyzed in triplicate for each type of extract and were incubated at 37 °C for 24 h. Growth inhibition halos were measured with a Vernier Calliper (Calliper, Lenfech, 0 mm - 150 mm measuring range). The antibacterial activity was assessed according to Capitani *et al*. (2016) parameters.

***In silico* antibacterial activity**

For *in silico* antibacterial activity, the crystal structure of key receptors for *E. coli* (2WUB, 4XO8) and *S. aureus* (2W9S, 2ZCO) were retrieved from the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/

). The structures were prepared using the Dock Prep Module of UCSF Chimera 1.14 (Pettersen *et al*., 2004) by removing water molecules, sidechains and ligands, adding hydrogens, and assigning partial charges. However, the Mg ion was kept due to its importance for the 4WUB protein function. Protein fragments were reconstructed by applying SWISS-MODEL (Waterhouse *et al*., 2018).

Ligands – Guanosine, Kaempferol-3-O-rutinoside, Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside, Kaempferol-3-O-rhamninoside, Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside) and Rutin – and control compounds (trimethoprim, farnesyl thiopyrofosfate, heptyl-α-D-mannopyrannoside, and phosphoaminophosphoric acid adenilate ester) were retrieved in Mole2 file format (.mol2) from PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al*., 2012) optimized f ligands' molecular geometry and converted the input files to .pdb files, later prepared using the Chimera docking tool.

All structures were aligned on a grid box large enough to accommodate all the experimental ligands used for molecular docking analysis. The grid size and the grid box coordinates for each target were as follows: 2WUB, 25×25×25 Å (14.57, 19.81, -10.80); 4OX8, 30×30×30 Å (-43.84, 5.15, 3.86); 2W9S, 25×25×25 Å (2.67, -2.13, 44.93); and 2ZCO, 30×30×30 Å (53.86, 10.35, 51.81). Ten independent docking runs were executed for each structure with the Autodock Vina tool (Eberhardt *et al*., 2021). Additionally, ten replicates were performed for each combination of ligand and receptor, which were analyzed through LigPlot+ (Laskowski *et al*., 2011) and PyMOL (De Lano *et al*., 2002).

Docking results were validated by extracting the co-crystallised ligands of the 2W9S, 2ZCO, 4XO8, and 4WUB proteins and re-docking them into the same position. The ligands pose with the lowest energy obtained on re-docking, and the co-crystallised ligands were superimposed to calculate the RMSD values in PyMOL software. The RMSD values must be within a reliable range of 2 Å to validate the docking process (Jug *et al*., 2015). Table 1 summarizes the binding affinity between the *C. chayamansa* compounds, bacterial proteins, and ligand-amino acid interactions.

Statistical analysis

Results were summarized by descriptive statistics using R Studio (V 4.2.1) and reported as mean ± standard error of the mean.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenolic compounds in ethanolic extracts of *C. chayamansa*

The concentration of phenolic compounds in the UAEE of *C. chayamansa* leaves was 143.7 mg of gallic acid equivalents

Table 1. Binding affinities between *C. chayamansa* compounds and bacterial proteins and ligand-amino acid interactions.
Tabla 1. Afinidades de unión entre compuestos de *C. chayamansa* y proteínas bacterianas e interacciones ligando-aminoácido.

Target	Ligand	Binding affinities (Kcal/mol)	Amino acid interactions
2W9S	Guanosine	-8.0	I14, G15, N18, Q19, K45, T46, I50, G94, Y98, T121
	Kaempferol-3-O-rutinoside	-9.5	I5, A7, L20, W22, H23, D27, L28, T46, I50, F92, Y98
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside	-7.7	A7, L20, H23, I31, L32, T46, I50, L52, R57, F92, Y98
	Kaempferol-3-O-rhamninoside	-9.3	A7, Q19, L20, L28, I31, T46, I50, F92, Y98
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)	-7.7	I5, A7, Q19, L20, T46, I50, L52, F92, Y98
	Rutin	-9.2	A7, L20, W22, H23, D27, T46, S49, I50, F92, G94, Y98
	Trimethoprim	**-7.6**	A7, I14, G46, N18, L20, D27, I31, T46, S49, F92, Y98, T121
2ZCO	Guanosine	-7.4	N17, H18, R45, D48, Q165, N168, D172, Y183, R265
	Kaempferol-3-O-rutinoside	-10.1	H18, R45, D48, Y129, Q165, V133, I169, D172, Y183
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside	-10.4	D49, D52, V111, D114, Q165, N168, N179, R181, D172, D176, R265
	Kaempferol-3-O-rhamninoside	-9.3	H18, Y41, R45, D49, D114, Y129, D172, R181, Y183
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)	-8.9	R45, D48, D49, V111, D114, Q165, D172, D176, R181, Y183
	Rutin	-9.8	D48, V111, D114, Y129, V133, Q165, N168, D176, R181, Y183
	Farnesyl thiopyrophosphate	**-7.2**	H18, F22, Y41, R45, A134, A157, L160, Q165, N168, R171, D172
4XO8	Guanosine	-6.6	F1, D46, D47, Y48, I52, D54, Q133, N135, D140, F142
	Kaempferol-3-O-rutinoside	-6.9	D37, L76, S78, G79, V93, V94, Y95, L101, P102, P104, V105
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside	-5.9	A2, C3, L4, G8, A10, P12, F43, H45, D47, R98, D100
	Kaempferol-3-O-rhamninoside	-6.9	F1, P12, H45, N46, D47, Y48, D54, R98, Q133, N135, D140, F142
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)	-6.1	A2, C3, A10, I13, P12, F43, H45, D47, R98, T99, D100
	Rutin	-6.8	D37, L76, S79, G79, V93, V94, Y95, L101, P102, P104
	Heptyl-α-D-mannopyranoside	**-6.5**	F1, I13, N46, D47, Y48, I52, D54, Q133, N135, D140,
4WUB	Guanosine	-8.3	N46, E50, D73, G77, I78, P79, I94, L103, Y109, V120, T165
	Kaempferol-3-O-rutinoside	-9.2	N46, A90, V93, I94, G101, G102, L103, D105, N107, S108, Y109
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside	-8.7	E50, I78, H83, V93, G101, G102, L103, D105, N107, Y109, R136
	Kaempferol-3-O-rhamninoside	-8.9	N46, E50, R76, P79, H83, I94, G101, G102, D105, N107, S108, Y108
	Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)	-8.5	P79, H83, A90, G101, G102, L103, D105, N107, S108, Y109, R136
	Rutin	-10.1	E50, D73, P79, H83, I94, G101, G102, L103, S108, Y109, G117
	Phosphoaminophosphoric acid adenylate ester	**-11.1**	N46, D73, V97, A100, G102, L103, L115, H116, G117, V118, G119, V120, S121, Q335, L337

(mg GAE)/g dry leaves. Guanosine nucleoside and different coumaric acid and kaempferol derivatives were identified (Table 2). Other compounds reported in extracts of *C. chayamansa* leaves are rutin, naringenin, chlorogenic acid, ferulic acid, protocatechuic acid, astragalin, caffeic acid, myristic acid, riboflavin, and β-carotene (Guzmán *et al*., 2020). Kaempferol has an antioxidant activity via free radical elimination (Hussain *et al*., 2021), coumaric acid (a hydroxycinnamic acid, i.e. a hydroxy metabolite cinnamic acid) has a high antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory potential related to the prevention of cardiovascular diseases (Liu *et al*., 2020).

In a study where the effect of the aqueous extract of chaya leaves (*Cnidoscolus aconitifolius*) in precarcinogenic lesions was evaluated, a minor concentration of total phenolic compounds (52.5 mg galic acid equivalents/g of dry leaf) was reported, which differs from our results. The presence of p-coumaric acid is reported, which together with rosmarinic acid, chlorogenic acid, resveratrol and luteoin are the major compounds in extracts obtained; other compounds identified were gallic acid, caffeic acid, vanilic acid, vanillin, resveratrol, apigenin y ferulic acid (Kuri-García *et al*., 2019). Us-Medina *et al*. (2020) evaluated the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of biologically active compounds from *C. aconitifolius* extracts, reporting a greater amount of phenolic compounds in aqueous extracts (706.1 mg galic acid equivalents/g of dry leaf) than those reported here; for ethanolic extracts, 351.3 mg galic acid equivalents/g of dry leaf were also reported in *C. aconitifolius* aqueous extracts. The concentration of phenolic compounds may vary according to the solvent used. Polar solvents are employed for plant extractions since they contain bonds between atoms that differ in electronegativity (e.g., O-H) and form hydrogen bonds; therefore, they are suitable for dissolving polar reactants such as ions (Li *et al*., 2018). Ethanol has a lower polarity than methanol, however, ethanol is Generally Recognized as Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA).

In vitro antioxidant activity

The antioxidant potential of natural extracts is associated with the content of phenolic compounds. The main antioxidant potential of the UAEE of *C. chayamansa* leaves was obtained in the Cu^{2+} chelation activity assays (65. 53 ± 1.72)

Table 2. Phenolic compounds detected in Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE). The identified compounds that showed a higher signal intensity are shown in bold.
Tabla 2. Compuestos fenólicos detectados en Extractos Etanólicos Asistidos por Ultrasonido (UAEE). Los compuestos identificados que mostraron una mayor intensidad de señal se muestran en negrita.

Peak #	RT (PDA detector)	λ max	Molecular ion ($[M-H]^-$) m/z	Fragments m/z	Tentative identification
1	6.93	253, 280sh	282	150	*Guanosine*
2	8.26	198, 266, 317	901	755, 593, 447, 355, 283	*Kaempferol 3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamnoside*
3	8.39	221, 280sh, 311	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer I)*
4	8.45	197, 290sh, 312	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer II)*
5	8.64	221, 295sh, 311	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer III)*
6	8.69	210, 290sh, 316	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer IV)*
7	8.86	196, 300	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer V)*
8	8.95	197, 290sh, 312	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer VI)*
9	9.11	195, 262sh, 310	355	209, 191, 147, 85	*Coumaroyl aldaric acid (Isomer VII)*
10	9.25	197, 254, 268sh, 343	755	300, 284	*Kaempferol 3-(2G-glucosylrutinoside)*
11	**9.57**	**210, 265, 346**	**739**	**284, 254, 227**	***Kaempferol 3-O-rhamninoside***
12	9.72	203, 255, 268sh, 352	609	300, 271	*Rutin*
13	**10.17**	**210, 265, 343**	**593**	**284, 254, 227**	***Kaempferol-3-O-rutinoside (Isomer I)***
14	**10.29**	**210, 265, 348**	**593**	**284, 254, 227**	***Kaempferol-3-O-rutinoside (Isomer II)***
15	10.56	195, 266, 307	593	284, 254, 227	*Kaempferol-3-O-rutinoside (Isomer III)*
16	10.90	197, 265, 344	593	284, 254, 227	*Kaempferol-3-O-rutinoside (Isomer IV)*
17	11.22	210, 265, 321	447	284, 254, 227	*Kaempferol-3-O-hexoside (Isomer I)*
18	11.66	197, 265, 346	447	284, 254, 227	*Kaempferol-3-O-hexoside (Isomer II)*

RT: Retention time

and Fe^{3+} reducing power (69.59 %). Regarding the ABTS and DPPH free radical trapping capacity, the antioxidant potential was less than 50 % (37.74 ±3.43 and 14.24± 0.22% respectively), and the Fe^{2+} chelation activity was 15.71 ± 0.82%. However, the antioxidant activity by the DPPH method was higher than that reported by García-Rodríguez *et al*. (2013), which was 10.66% in ethanolic extract of *C. chayamansa*, and 254.04 µmol Fe^{2+}/L for assay of ferric reducing power; this extract contained 35.7 mgEAG/g of leaf; the authors reported the presence of, coumarins, flavonoids, lignans and cyangenic glycosides. Among their findings, the authors reported that the ethanolic extracts of *C. chayamansa* also had anti-inflammatory activity in the *in vivo* model, although it was low, which was related to the concentration of phenolic compounds.

Antioxidant activity has also been reported in other species of the genus *Cnidoscolus*, although by other methods such as TEAC and ORAC, with values of 539 and 926 µmol Trolox equivalents/g of lyophilized extract respectively, in ethanolic extracts of *C. aconitifolius* leaf. These extracts had phenolic compounds (52.5 mg GAE/g) and flavonoids (41.6 mg catechin equivalent/g); the administration of these extracts in experimental animals protected against colon cancer in a model in which an oxidizing agent (azoxymethane) and an inflammatory agent (dextran sodium sulfate), through inhibiting cell proliferation and inflammation of colonic lesions by decreasing β-catenin and at long-term COX-2 reduction, although a high expression of NF-jB (Kuri-García *et al*., 2019).

In vitro and *in silico* antibacterial activity

For *in vitro* antibacterial activity assay, the inhibition halos in positive controls showed high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria strains (Table 3). Conversely, the halos of inhibition size in UAEE of *C. chayamansa* leaves was less than 10 mm, hence, considered inactive (Capitani *et al*., 2016). This could have been mainly due to the solvent or extract concentration used, other authors reported that ethanol extract of *C. chayamansa* leaves contained flavonoids, saponins, cardenolides and polyphenols with antibacterial activity against *S. aureus*, with an inhibition zone of 13.2 mm, greater than that found in this study (9.96 mm). Also, for the test in *E. coli* the activity was greater (14.83 mm) than that reported by us (7.9 mm). On the other hand, they demonstrated that *C. chayamansa* extracts obtained with different solvents had activity agains Gram-positive pathogenic bacteria (*B. Cereus* and *S. pyogenes*) and Gram negative pathogenic bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*), using ciprofloxacin as a control (Elizabeth *et al*., 2023).

Table 3. Antibacterial activity of Ultrasonic Assisted Ethanolic Extracts (UAEE) from *C. chayamansa* leaves.
Tabla 3. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos por ultrasonicación (UAEE) de hojas de *C. chayamansa*.

	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*
UAEE	7.90*	9.96*
AMC	20.05****	42.93****
C-	7.28*	6.46*

UAEE: Ultrasonic Assisted Ethanolic Extract, AMC: amoxicillin with clavulanic acid C+; positive control)y C-: negative control *inactive, ** partially active, ***active **** very active (Capitani *et al*., 2016).
UAEE: Extracción Etanólica Asistida por Ultrasonido; AMC: Amoxicilina con ácido clavulánico; C+ Control positivo; C- Control negativo; *inactivo, ** parcialmente activo, ***activo y **** muy activo (Capitani *et al*., 2016).

For *in silico* assays, target proteins can be proposed for future tests, either *in vitro* or *in vivo*, in this sense, target proteins involved in the viability of *S. aureus* were selected for antibacterial potential evaluation of the extracted compounds against these microorganisms (Figure 1). Firstly, Dihydrofolate Reductase (DHFR, 2W9S) (https://www.rcsb.org/structure/2w9s) involved in the folic acid pathway in *S. aureus*, which promotes thymidylate biosynthesis essential for cell replication and proliferation (He *et al*., 2020; Bourne *et al*., 2010). Secondly, Dehydrosqualene Synthase (CrtM, 2ZCO) (https://www.rcsb.org/structure/2ZCO) responsible for synthesizing the golden carotenoid pigment staphyloxanthin of *S. aureus*, which provides its antioxidant properties, aiding bacteria survival within the host cell (Kahlon *et al*., 2010; Wu *et al*., 2019). Inhibitors targeting DHFR and CrtM potentially induce bacterial death and serve as effective targets for treating bacterial infections.

Molecular docking was conducted to determine the target protein–compound binding energy. All six characterized compounds were docked against 2W9S and 2ZCO proteins using Autodock Vina. Almost all the evaluated ligands showed higher affinities than the co-crystallized ligands found in the crystal structures of each target during re-docking. The most favorable ligand-target complexes were Kaempferol-3-O-rutinoside-2W9S (-9.5 kcal/mol) and Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside-2ZCO (-10.4 kcal/mol).

Two targets from *E. coli* were selected to evaluate the inhibitory potential of the compounds identified through the UAEE of *C. chayamansa* leaves. The first target is the FimH protein (4XO8), a bacterial adhesion lectin located at the tip of *E. coli* type 1 fimbriae or pili. These structures facilitate bacterial binding to surfaces that display mannose residues (Hartmann et al., 2011; Magala et al., 2020). The second target is the DNA gyrase B subunit (4WUB), which plays a crucial role in regulating the physiological function of the genome and providing the energy required for DNA supercoiling (Sissi et al., 2010). This enzyme is an ideal target for antibacterial drugs due to its potential for selective toxicity (Sissi *et al*., 2010; Fois *et al*., 2020).

Molecular docking evaluated the binding energy between the 4XO8 and 4WUB proteins, and the six compounds through Autodock Vina. The evaluated ligands showed similar affinities to the co-crystallized ligands, particularly with 4XO8. However, for 4WUB, the evaluated ligands exhibited slightly lower activity compared to the co-crystallized ligand, Phosphoaminophosphoric acid adenylate ester. The most favorable ligand-target complexes were Kaempferol-3-O-rutinoside-4XO8 (-6.9 kcal/mol) and Rutin-4WUB (-10.1 kcal/mol).

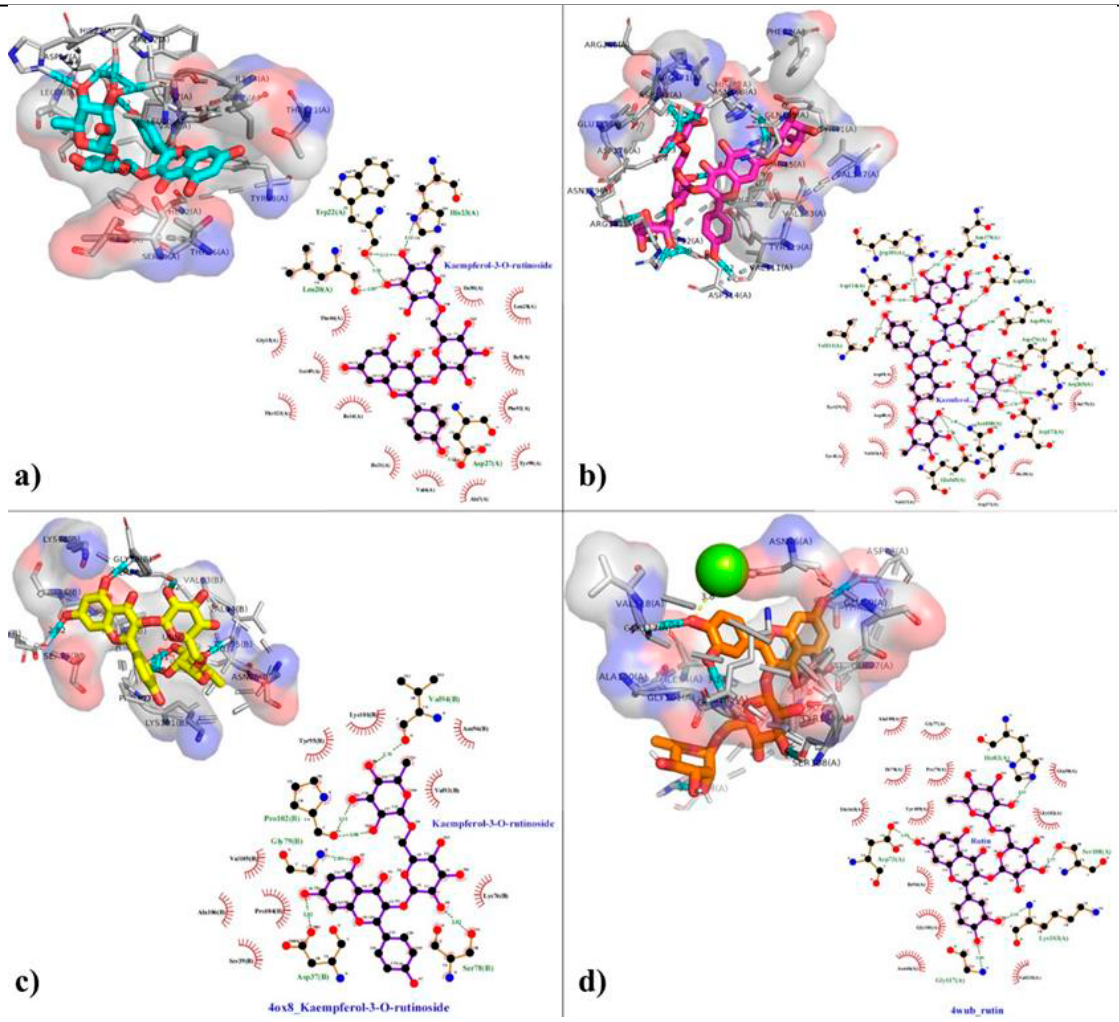


Figure 1. Two and three-dimensional representation of the hydrogen bonding and hydrophobic interaction between ligands within the binding cavity of receptors. a) Kaempferol-3-O-rutinoside-2W9S complex, b) Kaempferol-3-(2G-glucosylrutinoside)-7-rhamninoside-2ZCO complex, c) Kaempferol-3-O-rutinoside-4OX8 complex and d) Rutin-4WUB complex.
Figura 1. Representación bidimensional y tridimensional de los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrofóbica entre ligandos dentro de la cavidad de unión de los receptores. a) Complejo Kaempferol-3-O-rutinósido-2W9S, b) Complejo Kaempfe-rol-3-(2G-glucosilrutinósido)-7-ramninósido-2ZCO, c) Complejo Kaempfe-rol-3-O-rutinósido-4OX8 y d) Rutin-4WUB complejo.

Due of the results obtained, it´s possible that the compounds from the *C. chayamansa* extract could exert a bacteriostatic effect on *E. coli* cultures during the *in vitro* antibacterial activity evaluation via inhibition of 4WUB, explaining the observed inhibition halos, such as Tang *et al*. (2022) and Biasi-Garbin *et al*. (2022) obtained with similar methodologies. On the other hand, 4XO8 inhibition was unclear in the *in vitro* evaluation; however, it suggests that the evaluated compounds can bind to these lectins, thereby obstructing bacterial adhesion to host tissues.

CONCLUSIONS

The compounds present in UAEE from *C. chayamansa* leaves, are guanosine nucleoside and different coumaric acid and kaempferol derivatives. These compounds could be related to Cu^{2+} chelation activity and Fe^{3+} reducing antioxidant power. Although the antibacterial activity is not conclusive in the inhibition halos assays, the molecular docking results suggest that the identified compounds could intervene in metabolic processes necessary for the survival and replication of *E. coli* and *S. aureus*. Therefore, subsequent studies are necessary to evaluate the effect of different concentrations of *C. chayamansa* leaves extracts and their isolated compounds on bacterial strains.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the School of Nutrition from Universidad Anahuac Mayab for providing the facilities, CONAHCyT for granting a research scholarship, and ECOSUR for financially supporting the project through the Master's Thesis Support Program.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Bautista-Robles, V., Guerrero-Reyes, G., Sánchez-Torres, G.I., Parada-Luna, F., Barrios-Gutiérrez, J.J., Vázquez-Cerero, D., Martínez-Sala, G., Siliceo-Murrieta, J.I., González-Villoria, R.A.M., and Keita, H. 2020. *Cnidoscolus aconitifolius*: therapeutic use and phytochemical properties. Literature review. Revista de la Facultad de Medicina. 68(3):446-452. doi: 10.15446/revfacmed.v68n3.75184

Belabdelli, F., Bekhti, N., Piras, A., Benhafsa, FM., Ilham, M., Adil, S., and Anes, L. 2022. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Crataegus monogyna* leaves extracts. Natural Products Research. 36(12):3234-3239. doi: 10.1080/14786419.2021.1958215

Biasi-Garbin, R.P., Fabris, M., Morguette, A.E.B., Andriani, G.M., Cabral, W.R., Pereira, P.M., Brito, T.O., Macedo Jr, F., Da Silva-Lima, C.H., Nakamura, C.V., Pinge-Filho, P., Tavares, E.R., Yamauchi L.M., Bispo, M.L.F., and Yamada-Ogatta, S.F. 2022. In vitro antimicrobial screening of benzoylthioureas: Synthesis, antibacterial activity toward *Streptococcus agalactiae* and molecular docking study. ChemistrySelect, 7(34), e202202117. doi: 10.1002/slct.202202117

Bourne, C.R., Barrow, E.W., Bunce, R.A., Bourne, P.C., Berlin, K.D., and Barrow, W.W. 2010. Inhibition of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* by the broad-spectrum dihydrofolate reductase inhibitor RAB1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(9): 3825-3833. doi: 10.1128/AAC.00361-10

Capitani, M.I., Matus-Basto, A., Ruiz-Ruiz, J.C., Santiago-García, J.L., Betancur-Ancona, D.A., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., and Segura-Campos, M.R. 2016. Characterization of biodegradable films based on *Salvia hispanica* L. protein and mucilage. Food Bioprocess Technology. 9(8):1276-1286. doi: 10.1007/s11947-016-1717-y

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., and Abert-Vian, M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry. 34:540-560. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

De Lano, W.L. 2002. Pymol: an open-source molecular graphics tool, CCP4 Newsletter. On Protein Crystallography. 40:82-92.

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A., and Forli, S. 2021. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. Journal of Chemical Information and Modeling. 3891-3898, 61(8). doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203

Elizabeth, H., Channamma, G.M., Gnanasekaran, D., Karkera, R., Durairai G, and Kumar S. 2023. *In-vitro* antibacterial activity of *Cnidoscolus chayamansa* leaves extract on selective bacterial strain . World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. doi: 10.20959/wjpps202310-25786

Fois, B., Skok, Ž., Tomašič, T., Ilaš, J., Zidar, N., Zega, A., Peterlin Mašič, L., Szili, P., Draskovits, G., Nyerges, A., Pál, C., and Kikelj, D. 2020. Dual E*scherichia coli* DNA gyrase A and B inhibitors with antibacterial activity. ChemMedChem, 15(3), 265-269. doi: 10.1002/cmdc.201900607

Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G., and Luo, Z. 2020. Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. Ultrasonics Sonochemistry. 60:104726. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104726

Fukumoto, L.R., and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(8):3597-3604. https://doi.org/10.1021/jf000220w

Garcia, C., and Blesso, C. N. 2021. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. Free Radical Biology and Medicine, 172, 152-166. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.040

Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Pérez-González, M.Z., and Jiménez-Arellanes, M.A. 2016. Importancia nutricional, farmacológica y química de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*). Revisión bibliográfica. Revista de Temas Ciencia y Tecnologia. 20(60):43-56.

Guzmán, E.L., González, J.C.C., Flores, M.C., Carrillo, A.S., Pescador, M.G.N., and Cruz F.J.M. 2020. Effect on hyperglycemia and pancreas cells of chaya aqueous extracts from two different regions in streptozotocin-induced diabetes rats. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 56:1-5. doi: 10.1590/S2175-97902019000418782

Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeerschd, T., Zurek, E., and Hutchison, G. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. Journal of Cheminformatics. 1-17, 4(8).

Hartmann, M., and Lindhorst, T.K. 2011. The bacterial lectin FimH, a target for drug discovery–carbohydrate inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion. European Journal of Organic Chemistry (20-21), 3583-3609. https://doi.org/10.1002/ejoc.201100407

He, J., Qiao, W., An, Q., Yang, T., and Luo, Y. 2020. Dihydrofolate reductase inhibitors for use as antimicrobial agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 195, 112268. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112268

Hazafa, A., Rehman, K.U., Jahan, N., and Jabeen, Z. 2020. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. Nutrition and Cancer. 72(3):386-397. doi: 10.1080/01635581.2019.1637006

Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A.L., Lizardi-Jiménez, M. A., Pech-Cohuo, S., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J.C., García-Cruz, U., and Pacheco, N. 2021. Effect of solvent polarity on the ultrasound assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. Ultrasonics Sonochemistry, 76, 1-12. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105658

Huang, D.D., Shi, G., Jiang, Y., Yao, C., and Zhu, C. 2020. A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. Biomedicine & Pharmacotherapy, 125, 109767. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109767

Hussain, Z., Khan, J.A., Arshad, M.I., Muhammad, F., and Abbas, R.Z. 2021. Comparative characterization of cinnamon, cinnamaldehyde and kaempferol for phytochemical, antioxidant and pharmacological properties using acetaminophen-induced oxidative stress mouse model. Boletin Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromaticas. 20(4):339-350. doi: 10.37360/blacpma.21.20.4.25

Jug, G., Anderluh, M., and Tomašič, T. 2015. Comparative evaluation of several docking tools for docking small molecule ligands to DC-SIGN. Journal of Molecular Modeling. 21, 1-12 doi: 10.1007/s00894-015-2713-2

Kaabi, Y.A. 2022. Potential roles of anti-inflammatory plant-derived bioactive compounds: Targeting inflammation in microvascular complications of diabetes. Molecules. 27(21):7352. doi: 10.3390/molecules27217352.

Kahlon, A.K., Roy, S., and Sharma, A. 2010. Molecular docking studies to map the binding site of squalene synthase inhibitors on dehydrosqualene synthase of *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 28(2), 201-210. doi: 10.1080/07391102.2010.10507353

Kuri-García, A., Godínez-Santillán, R. I., Mejía, C., Ferriz-Martínez, R. A., García-Solís, P., Enríquez-Vázquez, A., García-Gasca T., Guzmán-Maldonado S.H., and Chávez-Servín, J. L. 2019. Preventive effect of an infusion of the aqueous extract of Chaya leaves (*Cnidoscolus aconitifolius*) in an aberrant crypt foci rat model induced by azoxymethane and dextran sulfate sodium. Journal of medicinal food, 22(8), 851-860. doi: 10.1089/jmf.2019.0031

Laskowski, R.A., and Swindells, M.B. 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. Journal of Chemical Information and Modeling. 51, 2778-2786. doi: 10.1021/ci200227u

Li, H., Han, J., Zhao, H., Liu, X., Ma, L., Sun, C., Yin, H., and Shi, Y. 2018. Investigation of the intermolecular hydrogen bonding effects on the intramolecular charge transfer process of coumarin 340 in tetrahydrofuran solvent. Journal of Cluster Science. 29(4):585-592. doi:10.1007/s10876-018-1371-9.

Liu, X., Ji, D., Cui, X., Zhang, Z., Li, B., Xu, Y., Chen, T., and Tian, S. 2020. p-Coumaric acid induces antioxidant capacity and defense responses of sweet cherry fruit to fungal pathogens. Postharvest Biology and Technology. 169:111297. doi:10.1016/j.postharvbio.2020.111297.

Magala, P., Klevit, R.E., Thomas, W.E., Sokurenko, E.V., and Stenkamp, R.E. 2020. RMSD analysis of structures of the bacterial protein FimH identifies five conformations of its lectin domain. Proteins 88(4), 593-603.M DOI: 10.1002/prot.25840

Ouadi, Y.E., Bendaif, H., Mrabti, H.N., Elmsellem, H., Kadmi, Y., Shariati, M.A., Abdel-Rahman, I., Hammouti, B., and Bouyanzer, A. 2017. Antioxidant activity of phenols and flavonoids contents of aqueous extract of *Pelargonium graveolens* orgin in the North-East Morocco. Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences. 6(5):1218-1220. doi:10.15414/jmbfs.2017.6.5.1218-1220.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera--a visual-ization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry. 25(13):1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084

Pérez-González, M.Z., Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Ortega, S., Siordia-Reyes, A.G., Jiménez-and Arellanes, M.A. 2019. Additional compounds and the therapeutic potential of *Cnidoscolus chayamansa* (McVaugh) against hepatotoxicity induced by antitubercular drugs. Biomedicine & Pharmacotherapy 117:1-10. doi:10.1016/j.biopha.2019.109140.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., and Serban, A.I. 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. European Journal of Medicinal Chemistry, 209, 112891. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112891.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical Biology and Medicine. 49(11):1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

Rodrigues, M.M.R., Ojeda, J.C.M., Díaz, M.G., and Allende DKB. 2021. Use of chaya (*Cnidoscolous chayamansa*) leaves for nutritional compounds production for human consumption. The Journal of the Mexican Chemical Society. 65:118-128. doi:10.29356/jmcs.v65i1.1433.

Ruiz, J.C.R., Ordoñez, Y.B.M., Basto, Á.M., and Campos, M.R.S. 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two S*tevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. Nutrición Hospitalaria. 31(3):1163-1170. doi:10.3305/nh.2015.31.3.8043.

Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(12):3661-3667. doi:10.1021/jf021156g

Sissi, C., Vazquez, E., Chemello, A., Mitchenall, L.A., Maxwell, A., and Palumbo, M. 2010. Mapping simocyclinone D8 interaction with DNA gyrase: evidence for a new binding site on GyrB. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(1), 213-22S DOI: 10.1128/AAC.00972-09

Sudha, G., Priya, M.S., Shree, R.I., and Vadivukkarasi, S. 2011. *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum aiton*). International Journal of Current Pharmaceutical Research. 3(2):137-140.

Tang, S., Chen, S., Tan, X., Xu, M., and Xu, X. 2022. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the pharmacodynamic substances and mechanism of "Mung Bean" against bacterial infection. Drug Development and Industrial Pharmacy, 48(2), 58-68.

Us-Medina, U., Millán-Linares, M.D.C., Arana-Argaes E., and Segura-Campos, M.R. 2020. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of Chaya extracts (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst). Nutricion Hospitalaria, 37(1), 46-55.

Vazquez-Armenta, F.J., Leyva, J.M., Mata-Haro, V., Gonzalez-Aguilar, G.A, Cruz-Valenzuela, M.R., Esqueda, M., Gutierrez, A., Nazzaro, F., Fratianni, F., Gaitan-Hernandez, R., and Ayala-Zavala, J.F. 2022. Phenolic compounds of *Phellinus* spp. with antibacterial and antiviral activities. Brazilian Journal of Microbiology, 53(3), 1187-1197. doi:10.1007/s42770-022-00745-x

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Research. 46, W296-W303.

Wu, S.C., Liu, F., Zhu, K., and Shen, J. Z. 2019. Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(48), 13195-13211.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Gas exchanges, $\delta^{13}C/^{12}C$ isotopic ratio and enzymatic activity in bell pepper under different irrigation sheets

Intercambio de gases, relación isotópica de $\delta^{13}C/^{12}C$ y actividad enzimática en pimiento morrón bajo diferentes láminas de riegos

Luz María Ruíz-Machuca[1]✉, Fernando Broetto[2]✉, Mara Lúcia Cruz de-Souza[3]✉, Renata Bruna dos Santos-Coscolin[3]✉, Vladimir Eliodoro Costa[4]✉, Mario García-Carrillo[1]✉, Ernesto Concilco-Alberto[5]✉

[1] Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit. Peripheric Raúl López Sánchez Km 1.5 and highway to Santa Fe. 27059, Torreón, Coahuila, Mexico.
[2] Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.
[3] Department of Rural Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.
[4] Center for Stable Isotopes, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.
[5] Graduated from the doctorate in science in agricultural production, Autonomous Agrarian University Antonio Narro. Mexico.

ABSTRACT

The cultivation of bell pepper demand irrigation practices to guarantee fruit production and quality. The objective of this work was to assess the physiological and biochemical changes, as well as the variation in isotopic discrimination of $\delta^{13}C$ in bell pepper plants submitted to different irrigation sheets. The experimental design was organized in a completely randomized design (CRD) with three treatments (irrigation sheets) and five replicas, sheet 1 (S1): Ψ_m = 10 to 15 kPa, sheet 2 (S2): Ψ_m = 34 to 40 kPa and sheet 3 (S3): Ψ_m = 54 to 60 kPa. Four evaluations were performed at 50, 65, 80 and 95 days after transplantation (DAT), measuring Leaf water potential (Ψ_{lw}), net CO_2 assimilation (*A*), stomatal conductance (*gs*), transpiration (*E*), isotopic discrimination ($\delta^{13}C/^{12}C$), enzyme activity of nitrate reductase (NR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Finally, fruits were collected to determine productivity. Bell pepper plants with less water availability and depending on their development, the leaf water potential was more negative, resulting in greater stomatal closure which caused a considerable decrease in the net CO_2 assimilation, transpiration, enzyme activity of nitrate reductase and fruit production, and greater activity of antioxidant enzymes. The increase and duration of water restriction in bell pepper plants induced less isotopic discrimination of $\delta^{13}C$.

Keywords: *Capsicum annuum* L., carbon assimilation, hydric stress, metabolism productivity.

RESUMEN

El cultivo de pimiento morrón demanda prácticas de riego para garantizar la producción y calidad del fruto. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios fisiológicos y bioquímicos, así como la variación en la discriminación isotópica de $\delta^{13}C$ en plantas de pimiento sometidas a diferentes láminas de riego. El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos (láminas de riego) y cinco repeticiones, lámina 1 (L1): Ψ_m = 10 a 15 kPa, lámina 2 (L2): Ψ_m = 34 a 40 kPa y lámina 3 (L3): Ψ_m = 54 a 60 kPa. Se realizaron cuatro evaluaciones a los 50, 65, 80 y 95 días después del trasplante (DDT), midiendo el potencial hídrico foliar (Ψ_{lw}), la asimilación neta de CO_2 (*A*), la conductancia estomática (*gs*), la transpiración (*E*), la discriminación isotópica ($\delta^{13}C/^{12}C$), actividad enzimática de nitrato reductasa (NR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Finalmente se recolectaron frutos para determinar la productividad. En plantas de pimiento morrón con menor disponibilidad de agua y, dependiendo de su desarrollo, el potencial hídrico foliar fue más negativo, resultando en un mayor cierre de estomas lo que provocó una disminución considerable en la asimilación neta de CO_2, transpiración, actividad de la enzima nitrato reductasa y producción de frutos y mayor actividad de las enzimas antioxidantes. El aumento y la duración de la restricción de agua en las plantas de pimiento morrón indujeron una menor discriminación isotópica de $\delta^{13}C$.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L., asimilación de carbono, estrés hídrico, productividad del metabolismo.

INTRODUCTION

Water deficiency (WD) is one of the most important environmental factors, which causes large losses in agriculture worldwide. Vegetables are the most sensitive to the lack of water compared to other crops (Kumar *et al*., 2012). Several studies confirm that the reduction of water in the soil during both the vegetative and the reproductive phase of bell peppers affects the final productivity (Ferrara *et al*., 2011; González-Dugo *et al*., 2007). Delfine *et al*. (2001) report that the growth of plants and the production of the first fruits, under dry farming conditions and in the vegetative phase, were not affected. However, as the WD increases and as the plants age, photosynthetic activity and stomatal conductance were reduced, affecting their growth and decreasing the final fruit production when compared to plants without water restriction.

*Author for correspondence: Luz María Ruiz-Machuca
e-mail: luzmy_rm@hotmail.com
Received: December 26, 2023
Accepted: August 5, 2024
Published: August 28, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2217

The isotopic discrimination of carbon $\delta^{13}C$ (calculated as the proportion $\delta^{13}C/^{12}C$) in leaves of C_3 plants correlates with the photosynthetic gas exchange, and its control depends on the concentration ratio of CO_2 in the intercellular spaces of leaves and the atmosphere (Farquhar *et al*., 1982). Therefore, the lower discrimination of plants between the two isotopes (more positive $^{13}C/^{12}C$) is due to the lower CO_2 pressure in their interior, when compared to environmental pressure (Ehlers and Goss, 2003). Thus, the ^{13}C isotope has been used as a criterion for crop improvement programs under conditions of water and salt stress (Yousfi *et al*., 2012; Araus *et al*., 2013).

In unfavourable environmental conditions, the rates of photosynthetic activity decrease, with a considerable increase in photorespiration, which induces the formation of reactive oxygen species (ROS) according to Miller *et al*. (2010). The ROS are more reactive molecules than molecular oxygen, which reacts with other macromolecules and can generate cascade reactions. ROS are extremely toxic, which can cause oxidative damage to proteins, DNA, and lipids that make up membranes (Apel and Hirt, 2004). The most common forms of ROS are superoxide radicals (O_2^-), hydroxyl (OH^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen ($^1O_2$).

Plants are able to adapt to the decrease in water potential and unfavorable climatic changes. This is done through the induction of antioxidative and non-enzymatic systems, which acts for the dismutation of ROS. Therefore, the essential enzymes of the antioxidative system are the superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and peroxiredoxin (PrxR). Other non-enzymatic antioxidants are ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH) (Wang *et al*., 2024). Another important enzyme for mineral metabolism in plants is the nitrate reductase (NR), responsible for the assimilative reduction of nitrate (NO_3^-). Several studies have corroborated that plants under WD decrease the enzymatic activity of NR, probably due to the lower flow of nitrate from the soil to the root (Dubey *et al*., 2021). Thus, the objective of this work was to assess the physiological and biochemical changes, as well as the variation in isotopic discrimination of $\delta^{13}C$ in bell pepper plants submitted to different irrigation sheets.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in greenhouse with an area of 63 m^2 at the Department of Chemistry and Biochemistry of the IB/UNESP in Botucatu-SP - Brazil, between January and May 2017 during the summer and autumn seasons. Gaston Bell pepper seedlings (*Capsicum annum* L.), which present a red coloring when ripe, were used. The transplant was performed 40 days after sowing (plants with 4 to 6 expanded leaves), in 22-litter pots. The planting mineral fertilization was as recommended by Freire *et al*. (2013), and the covering fertilization was based on the recommendations of Trani *et al*. (2011) which performs a balance of nutrients for each growth stage.

The bell pepper plants were irrigated by keeping the soil Ψ_m in the 10 to 15 kPa range until 50 DAT (at the beginning of flowering). The differentiation of the irrigation sheets was initialized at 51 DAT establishing the sheet 1 (S1): Ψ_m = 10 to 15 kPa, sheet 2 (S2): Ψ_m = 34 to 40 kPa and sheet 3 (S3): Ψ_m = 54 to 60 kPa. The drip irrigation system was used. Before the test, the water distribution uniformity test in the system was carried out using the distribution uniformity coefficient (DUC) method. For the monitoring of soil moisture, the tensiometry technique was used, previously determining the soil water retention curve (volumetric humidity as a function of the matric potential, $cm^3\ cm^{-3}$), using the Richards pressure camera method. For the soil water retention curve modelling, the SWRC (soil water retention curve) software, version 3.0, was utilized, described by Dourado-Neto *et al*. (2000) and adjusted to the Van Genuchten (1980) model. The irrigation sheets were calculated with the matric potential values of the soil ($cm^3\ cm^{-3}$), considering the concept of available water capacity (AWC) and irrigation efficiency. Finally, the irrigation time (in minutes) for each treatment was determined according to Equation 1:

$$\mathbf{It} = \left(\frac{\mathbf{Ab\ x\ A}}{\mathbf{n\ x\ q}}\right) * \mathbf{60} \qquad \text{Eq. (1)}$$

In which: It=irrigation time (min); Ab = applied sheet (mm); A = area occupied by plant (m^2); n = number of emitters per plant (1); q = dripper flow ($L\ h^{-1}$).

To maintain the established tension ranges, six tensiometers were installed per treatment, at a distance of 5 cm from the plant stem and 15 cm deep in the soil. Daily, from 8:00 to 8:30 a.m., the reading of the soil water tension was recorded with the aid of a digital tensimeter, and depending on the voltage value, irrigation was proceeded or not.

For all the evaluated variables, leaves from the middle third of the plants were used, except for fruit production. Leaf water potential (Ψ_{lw}) was measured from the same plants used for biometric determination (data not shown). Leaves were collected for the analysis of the isotopic ratio, total soluble protein content and determination of enzymatic activity. In the crops, the leaves were frozen with liquid nitrogen and kept in an ultra-freezer at -80 °C. Measurements of the water potential in the leaf xylem at 5:00 a.m. (predawn), were performed with the aid of a Scholander pressure chamber (Scholander *et al*., 1965), from Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, California-USA as described by Kramer and Boyer (1995). The net assimilation of CO_2 (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) were evaluated. For the measurements of photosynthesis a portable IRGA LI-COR 6400 was used between 9:00 and 11:30 a.m.

For Carbon isotope ratio analysis ($^{13}C/^{12}C$), the samples were analyzed at the Center for Stable Isotopes of the UNESP Biosciences Institute - Botucatu campus, state of Sao Paulo, Brazil. Part of the material (leaves) kept in the ultra-freezer at -80 °C was dried in a forced ventilation oven, at 50 °C for 48

hours. The dry material was milled in a cryogenic mill (2010 GENO / GRINDER - Spex Sample Prep., USA) for three minutes after cooling to -196 °C. Homogeneous samples with particle sizes smaller than 60 µm were obtained. The analyzes were performed by CF-IRMS (continuous flow isotope ratio mass spectrometry), using an IRMS (Delta V Advantage Isotope Ratio MS - Thermo Scientific, Germany) coupled to an elemental analyzer - EA (Flash 2000 Organic Elemental Analyzer - Thermo Scientific, Germany) through the interface (ConFlo IV Universal Interface - Thermo Scientific, Germany). The milled samples were weighed in tin capsules with approximately 50-70 µg, which were introduced through an automatic sampler in the EA where, in the presence of oxygen (O_2), they underwent combustion and reduction to obtain CO_2. The gases formed were directed to the IRMS using He as the carrier gas. The values of the isotopic ratio were expressed in delta value per thousand (δ ‰), relative to the PeeDee Belemnite (PDB) international standards for ^{13}C (Ducatti *et al*., 1982), according to the following general equation:

$$\delta\ ‰\ (sample, standard) = [(Rsample - Rstandard) / Rstandard] \times 1000 \quad \text{Eq. (2)}$$

Where R represents the ratio between the least abundant and the most abundant isotope, in particular $^{13}C/^{12}C$. Each sample was analyzed twice to obtain the average values; the measurements were repeated when the standard deviation was greater than 0.2 ‰ for δ ^{13}C.

For determination of the nitrate reductase enzyme (NR) activity, after four hours of illumination (solar time) leaves were collected from the plants, using 50 mg of fresh leaf tissue from each treatment, then transferred to test tubes with 10 mL of extraction solution (buffer KH_2PO_4 0.1 M; pH 7.0), 1 mL of KNO_3 0.1 M, and 1 mL of n-propanol (1 % C_3H_8O). The vegetable tissue was infiltrated in a vacuum three times and for two minutes with an interval of one minute. After infiltration, the tubes were covered with aluminum foil and kept in a water bath at 30 °C, for 60 min. A total of 1 mL of the extraction solution was removed from each tube and transferred to sterile tubes, adding 1 mL of 1 % sulfanilamide and 1 mL of 0.02 % N-naphthyl. Subsequently, the tubes containing the extraction solution plus these reagents were taken again into a water bath for 15 min at 30 °C in the dark. The final solution was placed in glass cuvettes to perform the absorbance reading on a spectrophotometer at 540 nm. The activity of the NR enzyme was expressed as nM of NO_2 per gram of fresh matter, per hour of incubation (nM NO_2 g^{-1} FM h^{-1}) (Jaworski, 1971).

To obtain crude extract for enzymatic analysis, leaves (keept in a freezer at -80 °C) were macerated in liquid N and transferred to Falcon tubes. The crude extract was obtained by resuspending the plant material (400 mg) in 5.0 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.7 and supplemented with 300 mg of PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Then, the extract was centrifuged for 15 min at 5000 rpm, the supernatant was collected and placed in *Eppendorf* tubes and stored in a freezer at - 80 °C for biochemical analysis.

The determination of superoxide dismutase (SOD) activity was determined by adding 50 µL of crude extract to a solution containing 13 mM methionine, 75 µM NBT, 100 nM EDTA and 2 µM riboflavin in 3.0 mL of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The reaction was initiated by lighting the Elisa plates containing the final extract in a chamber composed of fluorescent tubes (15 W), at 25 °C. After 5 min of incubation, the end of the catalysis was determined by the interruption of the light (Giannopolitis and Ries, 1977). The blue compound formed by NBT photoreduction was determined by the increase in absorption, by spectrophotometry at 560 nm. The tubes, considered white for the analysis, received the same reagents, but they were keep covered with aluminum foil. A unit of SOD was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50 % of NBT photoreduction. To calculate the specific SOD activity, the percentage of inhibition obtained, the sample volume and the protein concentration in the sample (µg $µL^{-1}$) was taken. The concentration of soluble protein was determined in triplicate, using the Bradford method (Bradford, 1976).

$$\text{Specific activity of the SOD} = \frac{\text{Control} - \text{Sample}}{\text{Control}} \times 100\ \%\ \text{inhibition} \quad \text{Eq. (3)}$$

For the determination of catalase enzyme activity (CAT), a total of 50 µL of crude extract were used, adding 950 µL of 50 nM potassium phosphate buffer solution, pH 7.0, supplemented with hydrogen peroxide at a final concentration of 12.5 mM. The activity of this enzyme was determined at 240 nm, by monitoring the variation in the absorption of hydrogen peroxide (80s), according to Peixoto *et al*. (1999). For the specific activity of catalase, the concentration of soluble protein (µKat µg $Prot^{-1}$) was considered. The fruit production was determined in the harvest, when fruits showed 70 % red color (20 plants per treatment). The number of fruits per plant and weight of each fruit was determined. Fruits with deformities, rot or burns were considered non-commercial (NC). For the determination of the total productivity, the recommended density for the pepper cultivation of 25 thousand ha^{-1} plants was considered.

Experimental design and statistical analysis

The trial was organized in a completely randomized design with three treatments and five repetitions. For the analysis of the results, an analysis of variance was applied by the F test, with the averages compared by the Tukey test at 5 % probability, using the *statistical analysis system* software (SAS) v. 9.2. The graphics were created with the aid of the 11.0 Sigma Plot v software.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf water potential (Ψ_{lw})

Water, in plants, moves from areas with higher Ψ_w (less negative) to areas with lower Ψ_w (more negative). Plant cells seek thermodynamic balance with the surrounding environment by absorbing or losing water (Taiz and Zeiger, 2002). The strategies of plants to tolerate water restriction (WR), include several physiological and biochemical processes, including

the reduction of Ψ_{lw} caused by the closure of stomata (Nardini *et al*., 2001), which was demonstrated in this test (Figure 3). Figure 1 show that the plants in sheet 1 maintained water potential values between -0.24 MPa and - 0.27 MPa during the performed evaluations. After the imposition of WR, the plants from irrigation sheets 2 and 3 showed values between -0.58 MPa and -0.65 MPa, and -0.80 MPa and -0.93 MPa, respectively. These results prove that, in bell pepper plants, the more negative the water potential is, the values of the components of gas exchange (Figures 2, 3 and 4) and fruit production (Table 5) are considerably reduced.

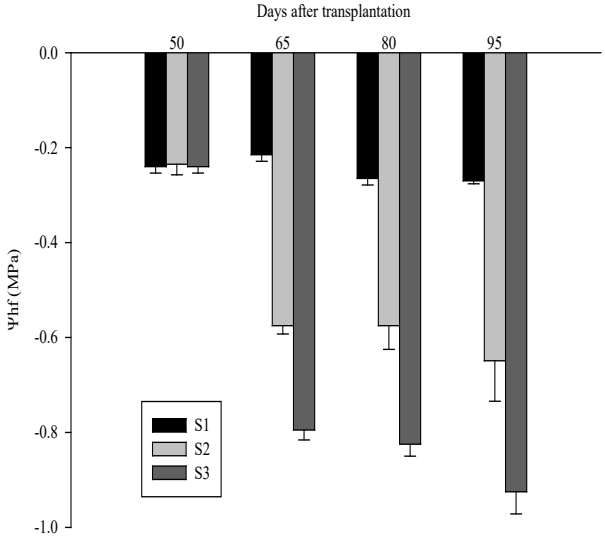


Figure 1. Leaf water potential (Ψ_{lw}) measured before dawn in bell pepper plants grown under three irrigation sheets. S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. Bars indicate standard dev iation (n=5).
Figura 1. Potencial hídrico foliar (Ψ_{lw}) medido antes del amanecer en plantas de pimiento morrón cultivado bajo tres láminas de riego. L1: Ψ_m = 10 a 15 kPa, L2: Ψ_m = 34 a 40 kPa y L3: Ψ_m = 54 a 60 kPa. Las barras indican la desviación estándar (n=5).

Gas exchange

Liquid CO_2 assimilation (*A*)

In figure 2, it can be observed that, when plants were submitted to WR, the photosynthesis gradually decreased as the water decreased in the soil. Similar results to this study, in which both the photosynthetic rate and the stomatal conductance decrease after the imposition of WR, were reported by Kulkarni and Phalke (2009). When working with different cultivars of hot pepper under conditions of protected environment and water restriction. Likewise, in seedlings (grafted and non-grafted) of mini-watermelon, these gas exchange components have decreased in parallel with the severity of water restriction (Rouphael *et al*., 2008).

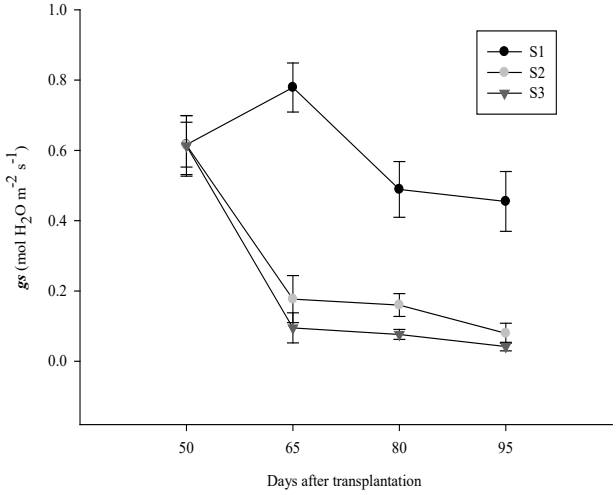


Figure 3. Stomatal conductance (*gs*) in bell pepper plants grown under three irrigation sheets. S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. Bars indicate standard deviation (n=5).
Figura 3. Conductancia estomática (*gs*) en plantas de pimiento morrón cultivadas bajo tres láminas de riego. L1: Ψ_m = 10 a 15 kPa, L2: Ψ_m = 34 a 40 kPa y L3: Ψ_m = 54 a 60 kPa. Las barras indican la desviación estándar (n=5).

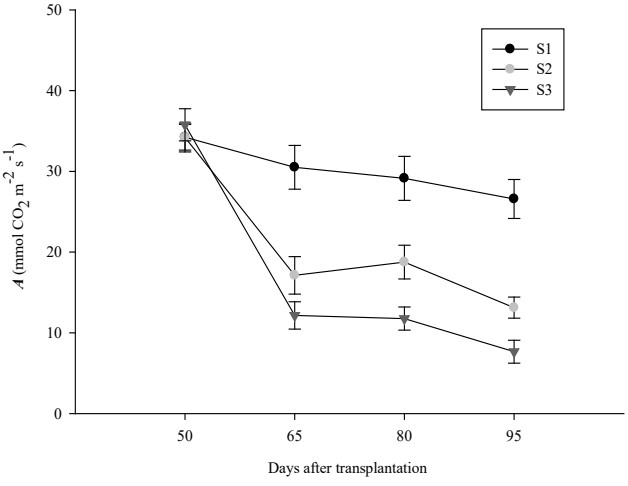


Figure 2. Liquid CO_2 assimilation (*A*) in bell pepper plants grown under three irrigation sheets. S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. Bars indicate standard deviation (n=5).
Figura 2. Asimilación de CO_2 líquido (*A*) en plantas de pimiento morrón cultivadas bajo tres láminas de riego. L1: Ψ_m = 10 a 15 kPa, L2: Ψ_m = 34 a 40 kPa y L3: Ψ_m = 54 a 60 kPa. Las barras indican la desviación estándar (n=5).

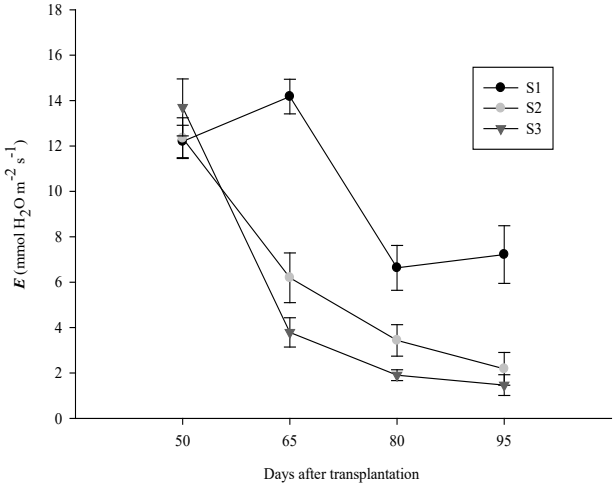


Figure 4. Transpiration (*E*) in bell pepper plants grown under three irrigation sheets. S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. Bars indicate standard deviation (n=5).
Figura 4. Transpiración (*E*) en plantas de pimiento morrón cultivadas bajo tres láminas de riego. L1: Ψ_m = 10 a 15 kPa, L2: Ψ_m = 34 a 40 kPa y L3: Ψ_m = 54 a 60 kPa. Las barras indican la desviación estándar (n=5).

Stomatal conductance (*gs*)

The *gs* is a parameter that indicates the opening and closing levels of the stomata, depending on the availability of water for the plant. Thus, WR promotes the opening reduction of stomatal pores, since the amount of water for the guard cells is reduced. In this test it was proved that the *gs* decreased considerably due to the severity of the WR (Figure 3), in response to the adaptation mechanisms of the plant itself to avoid dehydration, thus regulating its water status. Similarly, Paiva *et al*. (2005) reported that, in bean leaves, the *gs* decreased significantly in the flowering and grain filling stages in the treatment with less water availability.

Transpiration (*E*)

When plants have good water availability in the soil (field capacity) they have high transpiratory rates, facilitating water movement between the soil-plant-atmosphere. However, as the water content in the soil decreases as a result of the treatments, the plants decrease their transpiratory rate to reduce the loss of water in the form of steam. In this test (Figure 4) plants under water restriction showed lower values of *E* when compared to plants without water restriction. At 65 and 80 DAT, the plants of irrigation sheets 2 and 3 decreased their transpiratory rate respectively. At 95 DAT, the sheet 3 irrigation plants achieved transpiration rates similar to those of the irrigation sheet 2. This behavior, a result of WR, maintained a direct relationship with what happened in stomatal conductance (Figure 3), resulting in the closure of stomata in plants with less water availability as a strategy to avoid the excessive loss of water from plant tissues. Results similar to those in this trial were reported by Ferrara *et al*. (2011), who observed that when submitting bell pepper plants to WR the physiological variables, such as liquid CO_2 assimilation, stomatal conductance and transpiration significantly decreased in the vegetative and reproductive phases when compared to the control plants.

Isotopic carbon breakdown ($\delta^{13}C$)

In bell pepper plants, irrigation sheets 2 and 3 caused a decrease in the isotopic discrimination values of $\delta^{13}C$ to 80 DAT. In the last evaluation (95 DAT), only irrigation sheet 3 showed statistically less discrimination of $\delta^{13}C$ in relation to other treatments. These results agree with those reported in cotton crops (Brito *et al*., 2014) and sunflower (Adiredjo *et al*., 2014), in which the isotopic discrimination of $\delta^{13}C$ decreased in parallel with the severity of WR. That is, plants with scarce water availability in the soil have less isotopic discrimination of carbon. In this sense, the lower discrimination of $\delta^{13}C$ in plants with less water availability in the soil after 80 DAT may has been influenced by the lower CO_2 pressure (Figure 2) due to stomatal closure (Figure 3). That is a factor contributes to the discrimination during diffusion and carboxylation (Farquahr *et al*., 1982).

Activity of the nitrate reductase enzyme (NR)

The activity of the nitrate reductase enzyme has been used as an indicator of stress and changes linked to factors that modulate plant growth (Dubey *et al.,* 2021; Carelli *et al*., 1996). Table 2 shows that NR activity was also reduced in pepper plants after the imposition of water treatments (65 and 80 DAT). In the last evaluation (95 DAT), the irrigation 3 sheet plants differed statistically from irrigation 1 and 2 sheets plants. These results of the lower NR values under WR treatments are possibly related to the decrease in the photosynthetic rate (Figure 2), with nitrogen participating in the formation of chlorophyll, which is essential in the process of photosynthesis. Similarly, cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) under water stress have been reported to decrease NR activity in parallel with the decrease in leaf water potential (Marur *et al*., 2000), a fact that was also evidenced in the present trial (Figure 1).

Activity of the superoxide dismutase enzyme (*SOD*)

The increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase is a defense response of plants under stress conditions, since it is the first response line of the antioxidative system (Del Río *et al*., 2018). In Table 3 can be observed that, at 80 DAT, the plants in sheet 3 showed the highest SOD activity. In the last evaluation (95 DAT) the plants of sheets 2 and 3 had a significantly similar behavior, but with higher values to plants without water restriction. On the other hand, Yuan *et al*. (2016) worked with tomatoes under four soil moisture levels during two cycles under protected environment con-

Table 1. Carbon isotopic discrimination in bell pepper plants grown under three irrigation sheets.
Tabla 1. Discriminación isotópica de carbono en pimiento morrón cultivado bajo tres láminas de riego.

Treatment	50 DAT	65 DAT	80 DAT	95 DAT
	Carbon isotopic discrimination ($\delta^{13}C$)			
S1	-29.3 a	-30.1 a	-29.6 b	-29.3 b
S2	-29.3 a	-30.2 a	-28.4 a	-28.6 b
S3	-29.7 a	-29.8 a	-27.7 a	-27.1 a
P	0.4702	0.6332	0.0002	0.0020
CV (%)	2.0	2.4	1.7	2.7

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test, at the level of 5 % probability. DAT = days after transplant; S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. CV (%) = Percentage of the coefficient of variation.

Table 2. Nitrate reductase enzyme activity in bell pepper plants grown under three irrigation sheets.
Tabla 2. Actividad de la enzima nitrato reductasa en pimiento morrón cultivado bajo tres láminas de riego.

Treatments	50 DAT	65 DAT	65 DAT	95 DAT
	Nitrate reductase enzyme activity (nM NO_2 g^{-1} MF h^{-1})			
S1	2309.2 a	2127.8 a	1878.4 a	1038.9 a
S2	2385.6 a	1686.2 b	1491.1 b	833.3 a
S3	2306.2 a	1554.8 b	1365.1 b	247.1 b
P	0.7219	0.0004	0.0098	0.0001
CV	7.45	9.42	14.37	17.31

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test, at the level of 5% probability. DAT = days after transplant; S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. CV (%) = percentage of the coefficient of variation.

Table 3. Superoxide dismutase enzyme activity in bell pepper plants grown under three irrigation sheets.
Tabla 3. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en pimiento morrón cultivado bajo tres láminas de riego.

Treatment	50 DAT	65 DAT	80 DAT	95 DAT
	Superoxide dismutase enzyme activity (IU µg protein^{-1})			
S1	1.2 a	1.2 a	1.3 b	1.6 b
S2	1.1 a	1.6 a	1.5 b	2.2 ab
S3	1.0 a	1.9 a	2.5 a	2.7 a
P	0.779	0.147	0.0003	0.0149
CV (%)	18	13	20	11

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test, at the level of 5% probability. DAT = days after transplant; S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. CV (%) = percentage of the coefficient of variation.

ditions, noting that the SOD values increased according to the severity of WR in the growth stages.

However, in the fruit maturation stage, the plants of the control treatment (75 to 80 % of field capacity) and those of the treatment considered as mild water deficiency (55 to 60 % of the field capacity), showed significantly similar SOD values. Thus, according to the results reported by Yuan *et al*. (2016) and those of this test in bell pepper plants, the SOD values depend on the time of application of WR, severity, and phenological stage of the plants.

Catalase enzyme activity (CAT)

Several studies show that plants under stress conditions (biotic and abiotic) present accelerated production of reactive oxygen species (ROS), which can be toxic to the metabolism of plants or inhibit their growth. The dismutation of reactive oxygen species is performed by the antioxidative system, which comprises numerous enzymes and low molecular weight compounds (Banerjee and Roychoudhury, 2017). The catalase enzyme is the main enzyme that acts in the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water (H_2O) and molecular oxygen (O_2). In this trial, CAT activity (Table 4) was activated at 80 and 95 DAT in plants under water restriction, which showed significantly similar values between treatments, however, with values higher than those of irrigation sheet 1. Similar results to those obtained in this study were reported by Abid *et al*. (2017) in two greenhouse cultivars of fava beans (*Vicia faba* L.) in the winter period under three irrigation sheets (90, 60 and 30 % of field capacity). The results obtained for both cultivars (tolerant and susceptible) under the treatment considered as severe water restriction, showed significantly higher CAT activity when compared to the plants of the control treatment.

Table 4. Catalase enzyme activity in bell pepper plants grown under three irrigation sheets.
Tabla 4. Actividad de la enzima catalasa en cultivo de pimiento morrón cultivado bajo tres láminas de riego.

Treatments	50 DAT	65 DAT	80 DAT	95 DAT
	Activity of the catalase enzyme (µKat µg protein^{-1})			
S1	44.8 a	47.5 a	50.6 b	56.9 b
S2	46.7 a	60.3 a	64.5 ab	70.7 ab
S3	45.7 a	71.5 a	75.7 a	84.5 a
P	0.983	0.093	0.002	0.001
VC (%)	20	16	12	13

Means followed by the same letter in the column do not differ statistically from each other by the Tukey test, at the level of 5% probability. DAT = days after transplant; S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa. CV (%) = percentage of the coefficient of variation.

Bell pepper fruit production

On average, 7.4 fruits were collected per plant for irrigation sheet 1, with commercial productivity of 31.1 t ha^{-1} (Table 5). Plants of sheet 2 and 3 presented lower commercial productivity, in the order of 11.2 and 2.7 t ha^{-1}, respectively. It should be noted that the harvest period lasted 28 days. On the other hand, Carvalho *et al*. (2016) worked with different soil water tensions in the reproductive phase of red pepper cv. Konan, the authors reported production for the control treatment of 5.85 fruits per plant, equivalent to commercial production of 12.03 t ha^{-1} in protected environment conditions, with a 42-day harvest period. Thus, and according to the results obtained in this trial and those reported by other authors (Frizzone *et al*., 2001; Dermitas and Ayas, 2009), it is concluded that the decrease in water in the soil strongly affects the yield of peppers. In addition, it is emphasized that this difference in fruit productivity may vary according to the cultivar, season and climatic conditions.

Table 5. Production of ripe bell pepper fruits grown under three irrigation sheets.
Tabla 5. Producción de frutos maduros de pimiento morrón cultivados bajo tres láminas de riego.

Treatments	NFP	AFM (kg)	TFMP (kg)	TP (ha^{-1})	% NMF	PC (t ha^{-1})
S1	7.4	0.183	1.354	33.9	8	31.1
S2	5.4	0.128	0.691	17.3	35	11.2
S3	4.0	0.70	0.280	7.0	62	2.7

NFP = number of fruits per plant; AFM = average fruit mass; TFMP = total fruit mass per plant; TP = total production; % NMF = percentage of non-marketable fruits; CP = commercial production; S1: Ψ_m = 10 to 15 kPa, S2: Ψ_m = 34 to 40 kPa and S3: Ψ_m = 54 to 60 kPa.

CONCLUSIONS

Bell pepper plants with less water availability and according to their development, decreased relative to Ψ_{lw} resulting in a lower photosynthetic rate which may be related to stomatal closure, and therefore less discrimination of $\delta^{13}C$. Likewise, plants under water restriction showed a considerable reduction in the enzymatic activity of nitrate reductase (NR). Bell pepper plants have generated defense mechanisms to adapt to less water availability in the soil (decreased leaf water potential), increasing the activity of antioxidant enzymes in both superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), a strategy used to decrease the production of ROS. Therefore, the physiological and the biochemical parameters evaluated were affected according to the severity of the water deficiency, resulting in less fruit production and quality.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). Financing number: CNPq: 141414/2015-4.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Abid, G., M'hamdi, M., Mingeot, D., Aouida, M., Aroua, I., Muhovski, Y., Sassi, K., Souissi, F., Mannai, K., and Jebara, M. 2017. Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in faba bean (Vicia faba L.). Archives of Agronomy and Soil Science. 63: 536-552. https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1224857.

Adiredjo, A.L., Navaud, O., Lamaze, T., and Grieu, P. 2014. Leaf carbon isotope discrimination as an accurate indicator of water-use efficiency in sunflower genotypes subjected to five stable soil water contents. Journal of Agronomy and Crop Science. 200: 416-424. https://doi:10.1111/jac.12079.

Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. 55: 373-399. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.

Araus, J.L., Cabrera-Bosquet, L., Serret, M.D., Bort, J., and Nieto-Taladriz, M.T. 2013. Comparative performance of $\delta^{13}C$, δ 18O and δ 15N for phenotyping durum wheat adaptation to a dryland environment. Functional Plant Biology. 40: 595-608. http://dx.doi.org/10.1071/FP12254.

Banerjee, A., and Roychoudhury, A. 2017. Abiotic stress, generation of reactive oxygen species, and their consequences: an overview. Reactive Oxygen Species in Plants: Boon or Bane-Revisiting the Role of ROS, 23-50. https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch2

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.

Brito, G.G., Suassuna, N.D., Silva, V.N., Sofiatti, V., Diola, V., and Morello, C.L. 2014. Leaf-level carbon isotope discrimination and its relationship with yield components as a tool for cotton phenotyping in unfavorable conditions. Acta Scientiarum. Agronomy. 36: 335-345. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17986.

Carelli, M.L.C., Ungaro, M.R.G., Fahl, J.I., and Novo, M.C.S.S. 1996. Níveis de nitrogênio, metabolismo, crescimento e produção de girassol. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 8: 123-130.

Carvalho, J.deA., Rezende, F.C., Oliveira, E.C., and Aquino, R.F. 2016. Pimentão cultivado em ambiente protegido sob diferentes tensões de água no solo. Engenharia na Agricultura. 23: 236-245. https://doi.org/10.13083/reveng.v24i3.670.

Delfine, S., Loreto, F., and Alvino, A. 2001. Drought-stress effects on physiology, growth and biomass production of rainfed and irrigated bell pepper plants in the Mediterranean region. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126(3): 297-304. https://doi.org/10.21273/JASHS.126.3.297https://doi.org/10.21273/JASHS.126.3.297

Del Río, L. A., Corpas, F. J., López-Huertas, E., and Palma, J. M. 2018. Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants, 1-26.

Dermitas, C., and Ayas, S. 2009. Deficit irrigation effects n pepper (Capsicum annuum L. Demre) yield in unheated greenhouse condition. Journal of Food, Agriculture & Environment. 7: 989-993.

Dourado-Neto, D., Nielsen, D.R., Hopmans, J.W., Reichardt. K., and Bacchi, O.O.S. 2000. Software to model soil water retention curves (SWRC, version 2.00). Scientia Agricola. 57: 191-192. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162000000100031.

Dubey, R. S., Srivastava, R. K., and Pessarakli, M. 2021. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In Handbook of plant and crop physiology, pp. 579-616. CRC Press.

Ducatti, C., Matsui, E., and Salatti, E. 1982. Fundamentos teóricos dos fatores de correção para a análise das variações relativas das razões 13C/12C e 18O/16O por espectrometria de massa. Energ. Nucl. Agric. 4 (1): 41-58., 1982.

Ehlers, W., and Goss, M. 2003. Water Dynamics in Plant Production. CABI Publishing, Oxon/Cambridge.

Farquhar, G.D., O'leary, M.H., and Berry, J.A. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. Australian Journal Plant Physiology. 9: 121-137. https://doi.org/10.1071/PP9820121.

Ferrara, A., Lovelli, S., Di Tommaso, T., and Perniola, M. 2011. Flowering, growth and fruit setting in greenhouse bell pepper under water stress. Journal of Agronomy, 10(1): 12-19. https://10.3923/ja.2011.12.19.

Freire, L. R., Balieiro, F. C., Zonta, E., Anjos, L. H. C., Pereira, M. G., Lima, E., ... Polidoro, J. C. 2013. Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro Brasília, DF: Embrapa; Seropédica, RJ: Editora Universidade Rural. 430p.

Frizzone, J.A., Gonçalves, A.C.A., and Rezende, R. 2001. Produtividade do pimentão amarelo, Capsicum annum L., cultivado em ambiente protegido, em função do potencial mátrico de água no solo. Acta Scientiarum. 23: 1111-1116.

Giannopolitis, C.N., and Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology. 59: 309-314. https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309.

González-Dugo, V., Orgaz, F., and Fereres, E. 2007. Responses of pepper to deficit irrigation for paprika a production. Scientia Horticulturae. 114(2): 77-82. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.05.014.

Jaworski, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications. 43(6): 1274-1279. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80010-4.

Kramer, P.J., and Boyer, J.S. 1995. Water relations of plants and soils. San Diego, CA: Academic Press.

Kulkarni, M., and Phalke, S. 2009. Evaluating variability of root size system and its constitutive traits in hot pepper (Capsicum annum L.) under water stress. Scientia Horticulturae. 120(2): 159-166. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.007.

Kumar, R., Solankey, S.S., and Singh, M. 2012. Breeding for drought tolerance in vegetables. Vegetable Science. 39(1): 1-15.

Marur, C.J., Mazzafera, P., and Magalhães, A.C. 2000. Atividade da enzima redutase do nitrato em algodoeiro submetido ao déficit hídrico e posterior recuperação da turgescência. Scientia Agricola. 57: 277-281. https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000200013.

Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant, Cell and Environment. 33: 453–467. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x.

Nardini, A., Tyree M.T., and Salleo, S. 2001. Xylem cavitation in the leaf of Prunus laurocerasus and its impact on leaf hydraulics. Plant Physiol. 125: 1700-1709. https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1700.

Paiva, A.S., Fernandes, E.J., Rodrigues, T.J.D., and Turco, J.E.P. 2005. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. Engenharia Agrícola, 25(1): 161-169. https://doi.org/10.1590/S0100-69162005000100018.

Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., and Moreira, M.A. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 11(3): 137-143.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Colla, G., and Rea, E. 2008. Yield, mineral composition, water relations, and water use efficiency of grafted mini-watermelon plants under deficit irrigation. HortScience. 43(3): 730-736. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.730.

Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., and Hammel, H.T. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. Science, 148(3368): 339-346. https://doi: 10.1126/science.148.3668.339.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. (3rd ed). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publisher.

Trani, P.E., Tivelli, S.W., and Carrijo, O.A. 2011. Fertirrigação em Hortaliças. 2.ª ed. Revisado e atualizado. Campinas: Instituto Agronômico, 51p. (Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 196). Brazil.

Van Genuchten, M.Th. 1980. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. Soil Science Society of America Journal. 44(5): 892-898. https://doi.org/10.2136/sssaj1980.03615995004400050002x.

Wang, P., Liu, W. C., Han, C., Wang, S., Bai, M. Y., and Song, C. P. 2024. Reactive oxygen species: multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. Journal of Integrative Plant Biology, 66(3), 330-367. https://doi.org/10.1111/jipb.13601

Yousfi, S., Serret, M.D., Márquez, A.J., Voltas, J., and Araus, J.L. 2012. Combined use of $\delta^{13}C$, δ18O and δ15N tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. New Phytologist. 194(1): 230-244. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04036.x.

Yuan, X.K., Yang, Z.Q., Li, Y.X., Liu, Q., and Han, W. 2016. Effects of different levels of water stress on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of greenhouse tomato. Photosynthetica. 54: 28-39. https://doi: 10.1007/s11099-015-0122-5.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Efecto en las propiedades reológicas y texturales de pan elaborado a base de harina de trigo y harina de mijo tratada térmicamente

Effect on the rheological and textural properties of bread made from wheat flour and heat-treated millet flour

Marisol Padilla-Villalobos[1], Luis Enrique Robles-Ozuna[1], Alma Rosa Islas-Rubio[1], Benjamín Ramírez-Wong[2], Nina Gisella Heredia-Sandoval[1], María del Carmen Granados-Nevárez[1], Francisco Vásquez-Lara[1]*

[1] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, Número 46, Colonia La Victoria, Hermosillo, Sonora, México. C. P. 83304.

[2] Universidad de Sonora. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, México. C. P. 83000.

RESUMEN

La aplicación de tratamientos térmicos sobre harinas puede afectar de manera positiva sus propiedades funcionales. Por lo anterior, se realizó la sustitución de harina de trigo (HT) con el 10, 20 y 30 % de harina de mijo (HM) tratada térmicamente a 100 y 130 °C. En las mezclas de harinas se evalúo color, capacidad de retención de agua, perfil de viscosidad, gluten seco y tiempo óptimo de amasado. En las masas obtenidas se determinó fuerza (N) y extensibilidad (mm). En el pan se analizó el peso, volumen específico y perfil de textura. Los resultados obtenidos mostraron incrementos en la viscosidad final al utilizar HM tratada térmicamente a 100 y 130 °C a niveles de sustitución del 30 % (3606 cP y 3866 cP) con respecto a HT (2790 cP). También se presentaron incrementos de fuerza de la masa en sustituciones del 10 % con HM tratada a 100 y 130 °C (0.81 N y 0.69 N) comparada a la obtenida en HT (0.34 N). En cuanto al volumen específico del pan, se observaron valores muy semejantes en HT (4.78 cm^3/g) y el obtenido de la sustitución de HT con 10 % de HM tratada a 100 °C (4.19 cm^3/g).

El volumen específico es uno de los parámetros de calidad más importantes en productos de panificación, en este sentido se puede decir que la sustitución de harina de trigo con 10 % de harina de mijo tratada a 100 °C favoreció este parámetro, incluso resultó ser muy cercano al obtenido solo de harina de trigo.

Palabras clave: sustitución de harina de trigo, análisis reológico, proceso de panificación, caracterización del pan

ABSTRACT

The application of heat treatments on flours can positively affect their functional properties. Therefore, wheat flour (HT) was replaced with 10, 20, and 30 % of millet flour (HM) heat treated at 100 and 130 °C. In the flour mixtures, color, water retention capacity, viscosity profile, dry gluten and optimal kneading time were evaluated. In the dough, force (N) and extensibility (mm) were determined. In the bread, the weight, specific volume, and texture profile were analyzed. The results showed increases in the final viscosity when using HM heat-treated at 100 and 130 °C at substitution levels of 30 % (3606 cP and 3866 cP), compared to HT (2790 cP). There were also increases in the dough strength at 10 % substitutions with HM treated at 100 and 130 °C (0.81 N and 0.69 N), compared to HT (0.34 N). Regarding the specific volume of the bread, very similar values were observed in HT (4.78 cm^3/g) and that obtained from the substitution of HT with 10 % of MH treated at 100 °C (4.19 cm^3/g). The specific volume is one of the most important quality parameters in baking products, in this sense, it can be said that the replacement of wheat flour with 10 % of millet flour treated at 100 °C favored this parameter, even turning out to be very close to that obtained only from wheat flour.

Keywords: substitution of wheat flour, rheological analysis, baking process, characterization of bread

INTRODUCCIÓN

Los cereales son considerados uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, debido a que son la principal fuente de energía en la alimentación humana. La transformación de los cereales a harinas, por medio de la molienda, los colocan como materia prima importante para la elaboración de alimentos como tortillas, pastas, galletas, pan, entre otros (Vásquez *et al*., 2017). La harina de trigo es la más utilizada en la industria de panificación por sus propiedades funcionales, contenido de proteínas y su capacidad única para la formación de gluten cuando es mezclada con agua (Rosentrater y Evers, 2018). Sin embargo, la utilización de harinas compuestas es considerada como una ventaja en los países en desarrollo ya que reduce la importación de harina de trigo y fomenta el uso de cultivos locales para la elaboración de harinas (Hasmadi *et al*., 2014).

Los productos de panadería elaborados con harinas compuestas conservan algunas características similares al pan de harina de trigo, sin embargo, se presentan diferencias en la textura, valor nutricional y apariencia. El trigo es una buena fuente de calorías y otros nutrientes, pero pobre desde el punto de vista nutricional, ya que las proteínas de los cereales son deficientes en aminoácidos esenciales como la lisina y treonina (Noorfarahzilah *et al*., 2014). El creciente número de aplicaciones de harinas compuestas en diversos

*Autor para correspondencia: Francisco Vázquez Lara
Correo-e: fvas@ciad.mx
Recibido: 5 de diciembre de 2023
Aceptado: 7 de mayo de 2024
Publicado: 31 de mayo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2214

productos de panadería y pastelería, ha generado una producción importante de estudios acerca de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los diferentes tipos de materiales utilizados para producir harina. Las harinas de maíz, cebada, yuca y garbanzo, son de las más estudiadas para la elaboración de harinas compuestas, además de leguminosas como el chícharo, soya, frijol, lenteja, así como cereales malteados o germinados como el arroz y la cebada (Noorfarahzilah *et al*., 2014). Sin embargo, una alternativa a los anteriores es el mijo (*Panicum miliaceum*), el cual se destina principalmente para alimentación animal y en muy pocos países se emplea en panificación (Rosentrater y Evers, 2018).

Además de la sustitución de la harina de trigo con diferentes harinas, se ha observado que el proceso de panificación puede mejorarse cuando las harinas son tratadas térmicamente. Estas harinas pueden tener diversas aplicaciones dentro del procesamiento de alimentos, entre ellas están: la elaboración de alimentos infantiles, salsas, sopas, cremas y rellenos, espesantes, alimentos instantáneos, alimentos precocidos, confitería, mayonesas y pan. Russo y Doe (1970), fueron los primeros en patentar este proceso usando un rango de temperatura de 100 a 115 °C por 60 min. Se ha observado que el tratamiento térmico en harinas afecta la extensibilidad del gluten y la absorción de agua, así como la gelatinización del almidón (Vásquez *et al*., 2018). En harinas utilizadas en panificación, el tratamiento térmico ha incrementado la viscosidad y disminuido la firmeza en este tipo de productos (Gélinas *et al*., 2001). Estos efectos tienden a mejorar la elasticidad de la masa y producir un efecto positivo en el volumen del pan (Pyler, 1988). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue demostrar cómo la sustitución de la harina de trigo con harina de mijo tratada térmicamente puede ser una alternativa importante de mejora en el volumen específico y firmeza del pan, además de potencialmente disminuir el costo del producto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizó harina de trigo (HT) marca Los Gallos, la cual fue adquirida en un comercio local de Hermosillo, Sonora. También se utilizó harina de mijo (HM) marca Larissa Veronica adquirida en Tucson, Arizona. Otras materias primas utilizadas en el proceso de panificación fueron manteca vegetal (Marca Inca), levadura (Marca Nevada) y solución azúcar-sal, todas ellas se compraron en un comercio local.

Tratamiento térmico en harina de mijo

La HM fue sometida a dos tratamientos térmicos, 100 o 130 °C durante 30 min en una estufa (VWR International Modelo 1321F U.S.A). Después las harinas se acondicionaron en una cámara de fermentación a 30 °C y 90 % HR por 1 h para restituir la pérdida de humedad ocasionada por los diferentes tratamientos térmicos.

Preparación de las mezclas de harinas

Las formulaciones binarias que se evaluaron se basaron en la mezcla de la HM tratada térmicamente con la HT en las proporciones siguientes: 10/90, 20/80 y 30/70 (peso/peso), respectivamente.

Composición química de las harinas

A la HT y HM se les determinó humedad, proteína, grasa cruda y ceniza de acuerdo con los siguientes métodos: 44-40.01, 46-13.01, 30-20.01 y 08-01.01 (AACC, 2000), respectivamente. Los parámetros mencionados anteriormente se realizaron por triplicado. Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

Determinación de color

Se utilizó un colorímetro Konica Minolta (Modelo Chroma Meter CR-400, Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). El tamaño de apertura fue de 8 mm. Los parámetros evaluados fueron: L* (Luminosidad), a* (variación de rojo a verde) y b* (variación de amarillo a azul). Para la obtención de estos parámetros se realizaron 5 disparos dirigidos a diferentes puntos sobre la bolsa que contenía cada una de las mezclas de harinas.

Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA se realizó de acuerdo con el método 56-11.02 (AACC, 2000). Se colocaron 5 g de harina ± 0.05 g en un tubo de 50 mL (Nalgene Centrifuge Ware) al cual se le añadió 25 g de agua ± 0.05 g. La mezcla se agitó inicialmente por 5 s para suspender la harina. Después se agitó a los 5, 10, 15 y 20 min, seguida de centrifugación por 15 min a 1000 x g (Centrifuge Beckman Coulter Allegra X-30R, Brea, California, USA) a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el tubo conteniendo el pellet húmedo se invirtió para decantar por 10 min y finalmente ser pesado. Los cálculos se realizaron de acuerdo con Haynes *et al*. (2009). Este análisis se realizó por quintuplicado.

Perfil de viscosidad

Se obtuvo de acuerdo con el método 76-21.02 (AACC, 2000). Las mezclas de harinas no tratadas y las tratadas térmicamente se analizaron en base a 3.5 g ± 0.01 g de muestra ajustadas al 14 % de humedad. La cantidad de agua incorporada fue de 25 g ± 0.01 g resultado del propio ajuste al que se llevaron las harinas (Shittu *et al*., 2007). Se utilizó un viscosímetro RVA (Rapid Visco Analyser Super 4, Newport Scientific Australia). Mediante el software Thermocline se seleccionó el perfil de la prueba Estándar 1. La medición de esta prueba se llevó a cabo por duplicado.

Determinación de gluten seco

A 10 g de harina se le añadieron 5.5 g de solución salina al 2 % para mezclar hasta formar una masa firme y homogénea. Se dejó reposar por 5 min y se procedió a un amasado suave bajo el chorro de agua hasta remover todo el almidón soluble. La masa se estiró con el propósito de eliminar el exceso de agua, hasta que la superficie de la muestra de gluten se volvió adherente. El gluten húmedo obtenido anteriormente se secó en una estufa a 150 °C por 10 min, se retiró de la estufa y se pesó después de 20 min de atemperado. Después del

primer pesaje se partió el gluten manualmente y se volvió a secar por otros 10 min a 150 °C. Después la muestra se colocó en un desecador durante 24 h y se obtuvo un tercer pesaje con el cual se calculó el rendimiento del gluten seco (Espinoza y Quispe, 2013). Esta prueba se llevó a cabo por triplicado.

Tiempo óptimo de amasado (TOA)

En base a los valores de humedad y proteína de las mezclas de harinas tratadas térmicamente con HT, se calculó la cantidad de agua y harina para llevar a cabo el amasado en un Mixógrafo (National Mfg. Co. Lincoln, NE, USA), de acuerdo con el método 54-40.02 (AACC, 2000). Se analizó el gráfico obtenido y se determinó el TOA. Este análisis se realizó por duplicado.

Medición de fuerza (F) y extensibilidad (E)

La masa obtenida anteriormente se colocó dentro de una cámara de fermentación (30 °C y 90 % HR) por 20 min. Al cabo de este tiempo, la masa se colocó sobre una plataforma ranurada y sobre esta otra plataforma sin ranuras, prensándose por aproximadamente 30 s para formar las tiras de masas las cuales se introdujeron de nuevo en la cámara de fermentación por 45 min (Ktenioudaki *et al*., 2013). Al cabo de este tiempo se realizó la medición de F y E a una velocidad de prueba de 3.3 mm/s. La medición de los parámetros mencionados anteriormente se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Kieffer *et al*. (1988), utilizando un analizador de textura (TA-XT2, SMS/Kieffer dough extensibility Rig Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, England). Para la obtención de los parámetros mencionados anteriormente se realizaron diez mediciones.

Proceso de elaboración del pan

Se realizó por el método 10-10.03 (AACC, 2000). Se utilizaron 35 g de harina, 1.2 mL de manteca vegetal, 0.7 g de levadura, 3.83 mL de solución azúcar-sal (azúcar 42.44 %, sal 10.61 % y agua 46.93 %) y 21.55 mL de agua. La Figura 1 muestra un diagrama del proceso de elaboración del pan. Esta prueba se llevó a cabo por duplicado.

Propiedades físicas del pan

Peso del pan. Se pesó en una balanza inmediatamente después de extraerse del horno. Volumen específico del pan. Se obtuvo de la relación del volumen del pan/peso del pan y fue expresado en cm^3/g.

Análisis del perfil de textura (TPA)

De cada tratamiento se obtuvieron dos panes los cuales fueron rebanados a un grosor de 1.5 cm. Se utilizó un Texturómetro (TA-XT2, Texture Analyser Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) con la celda de carga de 5 kg y dispositivo TA-40 (40 mm de diámetro). La velocidad del ensayo fue de 1.7 mm/s para comprimir la rebanada el 50 % de su altura. El tiempo entre las compresiones fue de 5 s. Los parámetros obtenidos fueron: firmeza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad (Verdú *et al*., 2015).

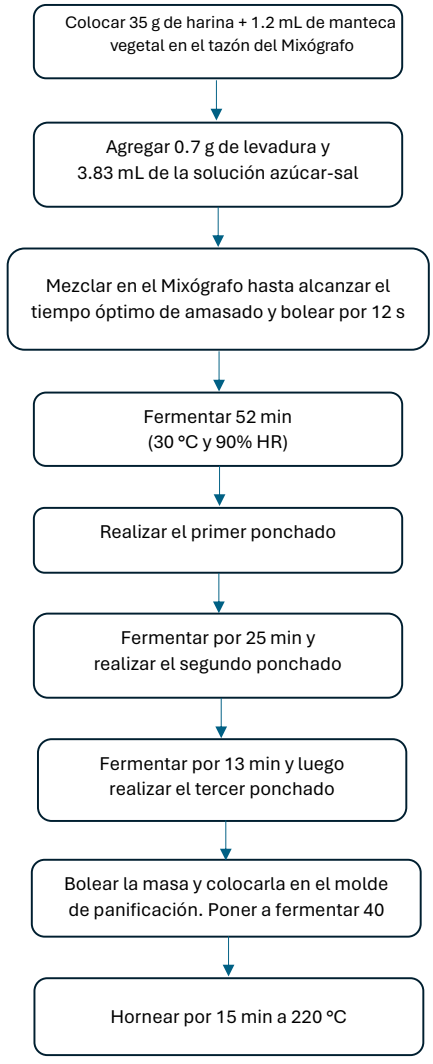


Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración del pan.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron aplicando un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Para discriminar entre las medias se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. El Análisis estadístico se llevó a cabo con el Programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies) con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos del análisis químico realizado a HT y HM. La importancia del conocimiento químico de las harinas es determinante en ocasiones para definir el posible uso que podrían tener en la industria. Se observó un incremento del 1.54 % de proteína en HT (11.61 % ± 0.31) con respecto a HM (10.07 ± 0.11). En panificación es muy importante el porcentaje de proteína, así como su calidad, por la influencia que tiene en el proceso de formación del gluten, que guarda una relación importante con el

volumen del pan. Otro componente muy importante es el contenido de ceniza, donde se observó un incremento de 0.47 % en HM con respecto a HT. En el procesamiento de harinas este parámetro es de suma importancia, ya que guarda una relación directa con el grado de extracción de esta, además de ser un parámetro relacionado con la calidad de la molienda y rendimiento (Vásquez, 2016).

Los resultados de color en las diferentes mezclas de harinas y CRA (Tabla 2) presentaron una disminución en el valor de L* (luminosidad) a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución, lo anterior fue para los dos tratamientos térmicos a las que fue sometida HM. Este mismo parámetro a niveles de sustitución del 30 % con la HM tratada a 100 y 130 °C fue muy semejante al valor obtenido en HT. En el caso particular de la medición de a* (variación de rojo a verde), este parámetro mostró un comportamiento similar al observado en L*. Lo contrario a este comportamiento fue cuando se analizó el valor de b* (variación de amarillo a azul). Estudios realizados por Hidalgo *et al*. (2014) observaron la influencia que tiene el contenido total de carotenoides, proteína y ceniza, además de la granulometría de las harinas que determinan de manera importante la percepción del color. Posner (2009), también observó que los procesos de molienda y las tasas de extracción tienen una influencia importante en componentes como proteínas, pigmentos y almidón dañado que afectan los valores de color cuando estos son medidos. Brandolini *et al*. (2008) también coincidieron que los valores de color en harinas pueden estar influenciados por el contenido de carotenoides y características genotípicas.

En cuanto a la CRA la tendencia observada fue de disminuir a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución de harina de trigo para los dos tratamientos térmicos (Tabla 2). A niveles de sustitución del 10 % se observaron valores muy semejantes con respecto a HT. El comportamiento anterior puede ser explicado por incrementos en el nivel de sustitución de HM generando en consecuencia una dilución de las fracciones proteicas involucradas en la formación del gluten, disminuyendo así la capacidad de las harinas para retener agua. Berton *et al*. (2002) determinaron la importancia del nivel de molienda de las harinas de trigo y la capacidad de retención de agua, donde un mayor nivel de molienda se traduce en un tamaño de partícula más pequeño y una mayor capacidad de retención de agua, así a cierto nivel de daño las propiedades mecánicas de la masa pueden verse afectadas de manera negativa.

El perfil de viscosidad de las mezclas de HT con HM en los niveles de sustitución del 10, 20 y 30 % sometida a tratamiento de 100 °C (Figura 2A) presentó una disminución en la viscosidad pico (2327, 2102 y 1916 cP) y viscosidad mínima (1403, 1230 y 1102 cP) a medida que se incrementó el nivel de sustitución, caso contrario a este comportamiento fue cuando se analizó la viscosidad final (3296, 3574 y 3606 cP). En este parámetro los valores observados fueron mayores a los que registró HT (2790 cP).

En lo que respecta al perfil de viscosidad de las mezclas de HT con HM en los tres niveles de sustitución donde HM fue tratada a 130 °C (Figura 2B), los resultados observados en la viscosidad pico (2363, 2261 y 2163 cP) mantuvieron

Tabla 1. Resultados del análisis químico proximal realizado a harina de trigo y harina de mijo.
Table 1. Results of the proximal chemical analysis carried out on wheat flour and millet flour.

Harina	% Humedad	% Proteína	% Grasa	% Ceniza	% Carbohidratos
Trigo	12.09 ± 0.12 a	11.61 ± 0.31 a	1.28 ± 0.18 a	0.70 ± 0.01 b	74.95
Mijo	9.27 ± 0.14 b	10.07 ± 0.11 b	1.22 ± 0.07 a	1.17 ± 0.01 a	78.27

Los datos son expresados como media ± desviación estándar. Los carbohidratos son resultado de la diferencia de 100 menos el resto de los componentes analizados. Medias con diferente letra en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 2. Análisis de color y capacidad de retención de agua (CRA) en harina de trigo (HT) y mezclas de HT con harina de mijo (HM) tratada térmicamente a 100 °C y 130 °C durante 30 min a niveles de sustitución del 10, 20 y 30%.
Table 2. Color and water holding capacity (CRA) analysis in wheat flour (HT) and mixtures of HT with millet flour (HM) heat-treated at 100 °C and 130 °C, at substitution levels of 10, 20 and 30%.

Harina	L*	a*	b*	CRA (%)
HT	93.33 ± 1.36 c	0.11 ± 0.03 a	8.06 ± 0.19 g	67.48 ± 0.81 b
HT/HM 10%-100 °C	94.51 ± 0.16 a	-0.34 ± 0.01 b	9.31 ± 0.17 e	68.13 ± 0.12 b
HT/HM 20%-100 °C	94.04 ± 0.08 ab	-0.53 ± 0.03 d	10.61 ± 0.12 c	60.58 ± 0.67 e
HT/HM 30%-100 °C	93.61 ± 0.18 abc	-0.65 ± 0.07 e	11.72 ± 0.26 a	59.52 ± 0.39 f
HT/HM 10%-130 °C	94.34 ± 0.23 a	-0.30 ± 0.02 b	9.06 ± 0.05 f	69.62 ± 0.10 a
HT/HM 20%-130 °C	93.86 ± 0.12 abc	-0.33 ± 0.02 b	9.94 ± 0.07 d	64.46 ± 0.45 d
HT/HM 30%-130 °C	93.26 ± 0.21 c	-0.42 ± 0.03 c	10.90 ± 0.07 b	65.38 ± 0.98 c

Los datos son expresados como media ± desviación estándar. Medias con diferente letra en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).
Data are expressed as mean ± standard deviation. Means with different letters in columns indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

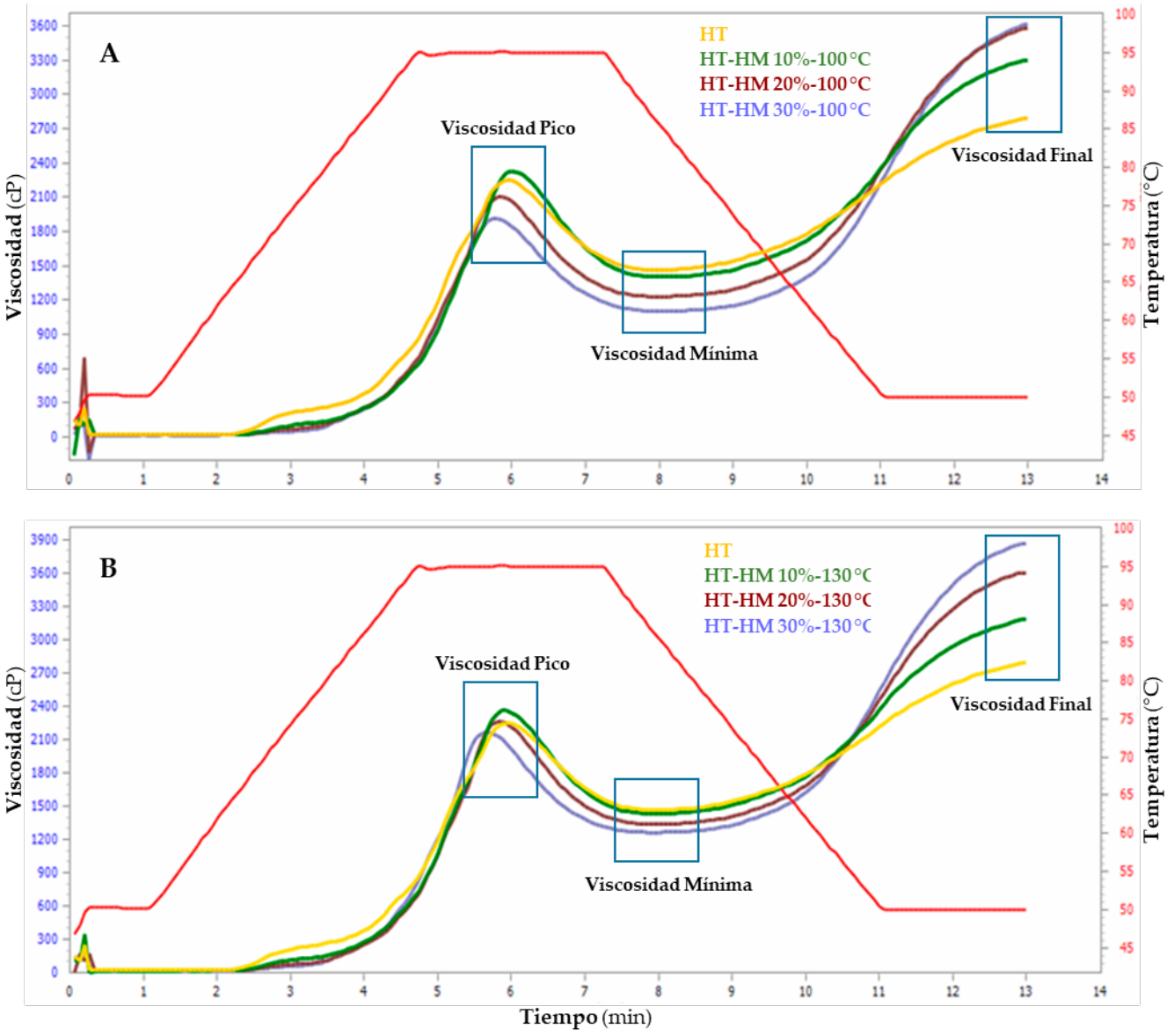


Figura 2. Perfil de viscosidad de HT (harina trigo) y las mezclas de HT con HM (harina mijo) tratada térmicamente a 100 °C (A) y 130 °C (B) en niveles de sustitución del 10, 20 y 30%.
Figure 2. Viscosity profile of HT (wheat flour) and mixtures of HT with HM (millet flour) heat treated at 100 °C (A) and 130 °C (B), at substitution levels of 10, 20 and 30%.

la misma tendencia que las harinas sometidas a 100 °C de tratamiento térmico, sin embargo, se logra apreciar un ligero aumento en este mismo parámetro. Con respecto a la viscosidad mínima (1431, 1337 y 1261 cP), la tendencia observada es la misma que la viscosidad pico con ligeros incrementos a los registrados por las muestras de HM sometida a 100 °C. En cuanto a la viscosidad final (3176, 3602 y 3866 cP) a niveles de sustitución del 20 y 30 % fue cuando se observaron los valores más altos con respecto a las muestras tratadas a 100 °C y la muestra de HT.

Este perfil de viscosidad lo relacionamos normalmente con el comportamiento del almidón, sin embargo, existen otros componentes muy importantes que están involucrados en esta prueba como son proteínas y lípidos. Estos componentes interactúan con el almidón y afectan la medición de viscosidad (Balet *et al*., 2019). La reducción en el hinchamiento de los gránulos de almidón es indicio de las bajas viscosidades pico y la disminución en la ruptura de los gránulos de almidón (Ktenioudaki *et al*., 2013). Los gránulos de almidón que tienen una alta capacidad de hinchamiento tienden a tener una alta viscosidad. La velocidad de calentamiento también tiene un efecto importante sobre la viscosidad pico. El cocimiento (empaste) es un fenómeno relacionado con la temperatura, el calentamiento de una mezcla más rápido provoca un rápido hinchamiento de los gránulos, lo que permite a estos que alcancen su máxima hinchazón y la contribución a la viscosidad antes de que su rompimiento comience a disminuir la viscosidad (Balet *et al*., 2019).

Los resultados obtenidos mostraron también una relación directa importante entre la viscosidad pico y la viscosidad mínima, en las cuales se observó que con el incremento en el nivel de sustitución disminuyen ambas viscosidades (pico y mínima). Estudios realizados por Blazek y Copeland (2008), con propiedades de viscosidad en harina de trigo e hinchamiento de almidones, obtuvieron valores promedio de 1510.8 cP para viscosidad mínima, valores bastantes cercanos a los obtenidos en nuestro estudio cuando HT se sustituyó con HM al 10 %.

Otro parámetro muy importante que se analizó fue la viscosidad final. Esta es la formada por el gel durante el enfriamiento de 50 °C a la que esta estandarizada la prueba, aquí sucede una re-asociación entre moléculas de almidón, principalmente amilosa que resulta en la formación de un gel que incrementa dicha viscosidad a medida que aumenta el tiempo de la prueba (Lei *et al*., 2008). Estudios realizados por Zaidul *et al*. (2007), observaron incrementos significativos en la viscosidad final cuando aumentaron el nivel de sustitución de harina de trigo con almidón en porcentajes de 10 a 50 %. Tadeu-Paraginski *et al*. (2014) encontraron para este parámetro de viscosidad fuertes interacciones entre almidón y proteína, además de un incremento en enlaces disulfuro que pueden ser responsables de altos valores de viscosidad final.

Determinación de TOA, gluten seco, fuerza (F) y extensibilidad (E)

El TOA (Tabla 3) no fue afectado de manera importante cuando se analizaron las diferentes mezclas de HT con HM. Se observaron valores muy semejantes estadísticamente ($p \geq 0.05$) con respecto a HT. En lo que respecta al parámetro de gluten seco (Tabla 3), la tendencia fue de disminuir a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución, este comportamiento fue observado cuando se utilizó HM tratada a 100 y 130 °C. Las sustituciones realizadas al 30 % fueron las que mostraron los valores más semejantes a HT.

La importancia en la evaluación de este parámetro se debe a la calidad y cantidad de la fracción proteica que poseen, debido a que es considerado un factor de suma importancia para la funcionalidad de la masa que determina principalmente su capacidad de panificación (Vásquez *et al*., 2018). La calidad de las harinas depende de un equilibrio específico entre gliadinas y gluteninas para elaborar un buen pan, además se requiere de un balance apropiado entre viscosidad y elasticidad de la masa. El gluten insuficientemente elástico conduce a obtener un pan de bajo volumen. El aumento de la elasticidad genera un pan de mayor volumen, pero también el gluten elástico impide la expansión de las células de gas que conducen de nuevo a bajar el volumen del pan (Barak *et al*., 2013). De acuerdo a lo anterior, el gluten juega un papel determinante en la apariencia y estructura de la miga de los productos elaborados a base de cereales (Demirkesen *et al*., 2010).

Otro parámetro analizado en la masa obtenida de las diferentes mezclas de harinas fue el de fuerza (Tabla 3). La tendencia fue a disminuir a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución sin importar el tratamiento térmico a la que fue sometida la HM. Todos los valores de fuerza obtenidos en las diferentes mezclas de HT-HM fueron mayores a la mostrada por HT. Por último, también se analizó la extensibilidad de las masas (Tabla 3) y no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en los niveles de sustitución del 10 y 20 % con respecto a la obtenida en HT. Sin embargo, a niveles de sustitución del 30 % con HM tratada térmicamente a 100 y 130 °C si se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a HT. Los valores más altos de extensibilidad fueron registrados en este último nivel de sustitución. Las propiedades reológicas de las masas son críticas en la manufactura de alimentos (Barak *et al*., 2013). La masa exhibe un comportamiento visco elástico, combinando las propiedades de un fluido viscoso y un sólido elástico. La combinación de harina, agua y levadura juega un papel muy importante que define la estructura y propiedades reológicas de la masa (Upadhyay *et al*., 2012).

Estudios realizados por Ktenioudaki *et al*. (2013) observaron cambios en las pruebas reológicas de las masas durante la adición de subproductos, ocasionados posiblemente por la adición de fibra la cual interactúa con el desarrollo del gluten

Tabla 3. Determinación del tiempo óptimo de amasado (TOA), gluten seco, fuerza y extensibilidad de HT (harina trigo) y mezclas de HT con HM (harina mijo) tratada térmicamente a 100 y 130 °C durante 30 min a niveles de sustitución del 10, 20 y 30 %.
Table 3. Determination of the optimal kneading time (TOA), dry gluten, strength and extensibility of HT (wheat flour) and mixtures of HT with HM (millet flour) heat treated at 100 and 130 °C, at substitution levels of 10, 20 and 30 %.

Harina	TOA (min)	Gluten seco (g)	Fuerza (N)	Extensibilidad (mm)
HT	5.30 ± 0.07 c	1.22 ± 0.04 b	0.34 ± 0.03 g	38.55 ± 12.71 bc
HT/HM 10%-100°C	6.21 ± 0.21 a	2.01 ± 0.01 a	0.81 ± 0.04 a	36.14 ± 10.29 c
HT/HM 20%-100°C	5.36 ± 0.14 c	1.47 ± 0.04 b	0.58 ± 0.04 c	46.22 ± 12.11 ab
HT/HM 30%-100°C	5.39 ± 0.07 bc	1.05 ± 0.14 bc	0.41 ± 0.06 f	48.08 ± 13.87 a
HT/HM 10%-130°C	5.54 ± 0.42 abc	1.58 ± 0.04 b	0.69 ± 0.07 b	47.17 ± 12.19 ab
HT/HM 20%-130°C	6.12 ± 0.14 ab	1.41 ± 0.01 b	0.52 ± 0.03 d	44.56 ± 15.31 abc
HT/HM 30%-130°C	5.45 ± 0.35 c	1.04 ± 0.16 c	0.44 ± 0.02 e	49.91 ± 9.12 a

Los datos son expresados como media ± desviación estándar. Medias con diferente letra en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).
Data are expressed as mean ± standard deviation. Means with different letters in columns indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

causando cambios en sus propiedades reológicas. Este comportamiento ha sido reportado por Rieder *et al*. (2012), quien trabajó sobre la calidad reológica de la masa al ser sustituida la HT con harinas de cebada y de avena. Estos autores observaron también como la fuerza y extensibilidad disminuyeron por dilución del gluten de trigo cuando el contenido de fibra aumentó, lo que puede generar un rompimiento de la red de gluten durante la formación de la mezcla.

Peso y volumen específico del pan

Los parámetros físicos analizados en pan fueron peso y volumen específico (Figura 3). En lo que respecta al peso, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) cuando se analizó el obtenido de HT y la mezcla de HT con HM al 10 % sometida a 100 °C. Sin embargo, con el resto de las mezclas sí se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). También se analizó el volumen específico obtenido de la relación del volumen del pan y su peso. La tendencia fue a disminuir a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución de HM.

Aumentos en el volumen específico se atribuyen a la capacidad de retención de gas del gluten (Wu *et al*., 2012). Al incrementar el nivel de sustitución reduciendo por dilución el gluten contenido en las mezclas de harinas, generó volúmenes específicos más bajos con respecto al obtenido de HT.

Es importante considerar en este estudio que no necesariamente las masas que mostraron valores más altos de fuerza o extensibilidad fueron de las que se obtuvieron volúmenes específicos más altos de pan. Lo que sí fue evidente es que el tratamiento térmico de 100 °C sobre HM (4.18 cm^3/g) y niveles de sustitución del 10 % favoreció con valores muy cercanos de volumen específico al obtenido de HT (4.78 cm^3/g). Por lo tanto, un balance entre fuerza y extensibilidad de las masas determinado por la cantidad y calidad de sus proteínas es necesario para la obtención de volúmenes adecuados de pan.

Análisis del perfil de textura (TPA)

La Figura 4 muestra los valores de firmeza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de los panes obtenidos de las dife-

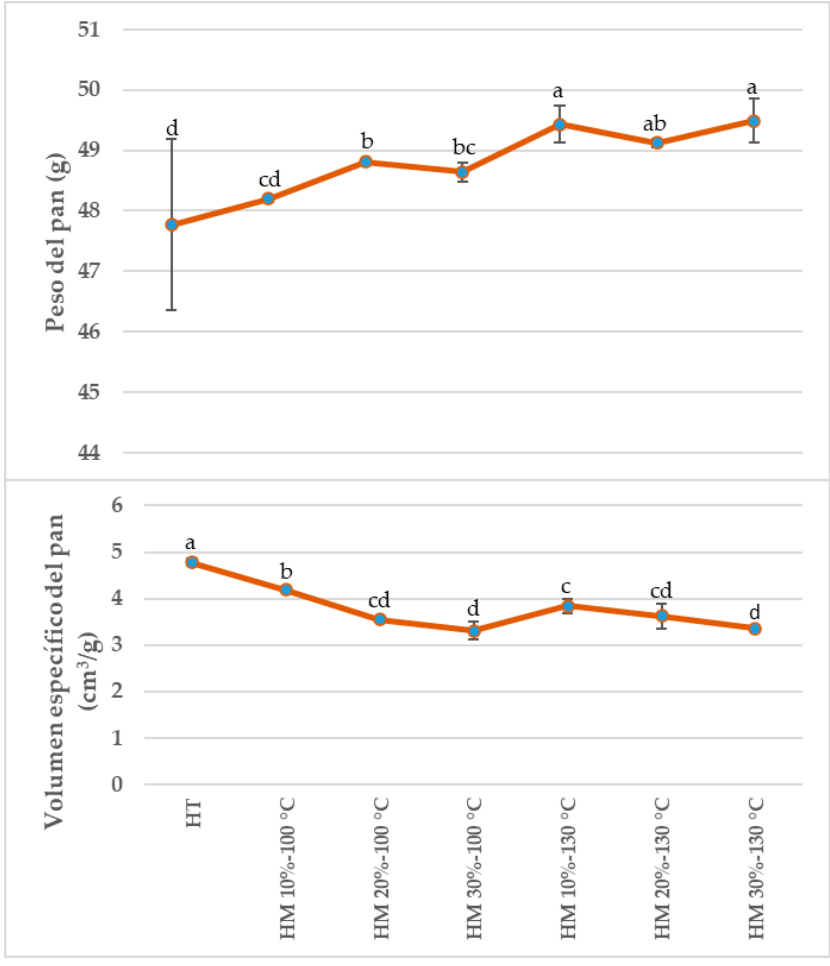


Figura 3. Propiedades físicas del pan obtenido de HT (harina trigo) y mezclas de HT con HM (harina mijo) tratada térmicamente a 100 y 130 °C durante 30 min a niveles de sustitución del 10, 20 y 30%.
Figure 3. Physical properties of bread obtained from HT (wheat flour) and mixtures of HT with HM (millet flour) heat-treated at 100 and 130 °C, at substitution levels of 10, 20 and 30%.

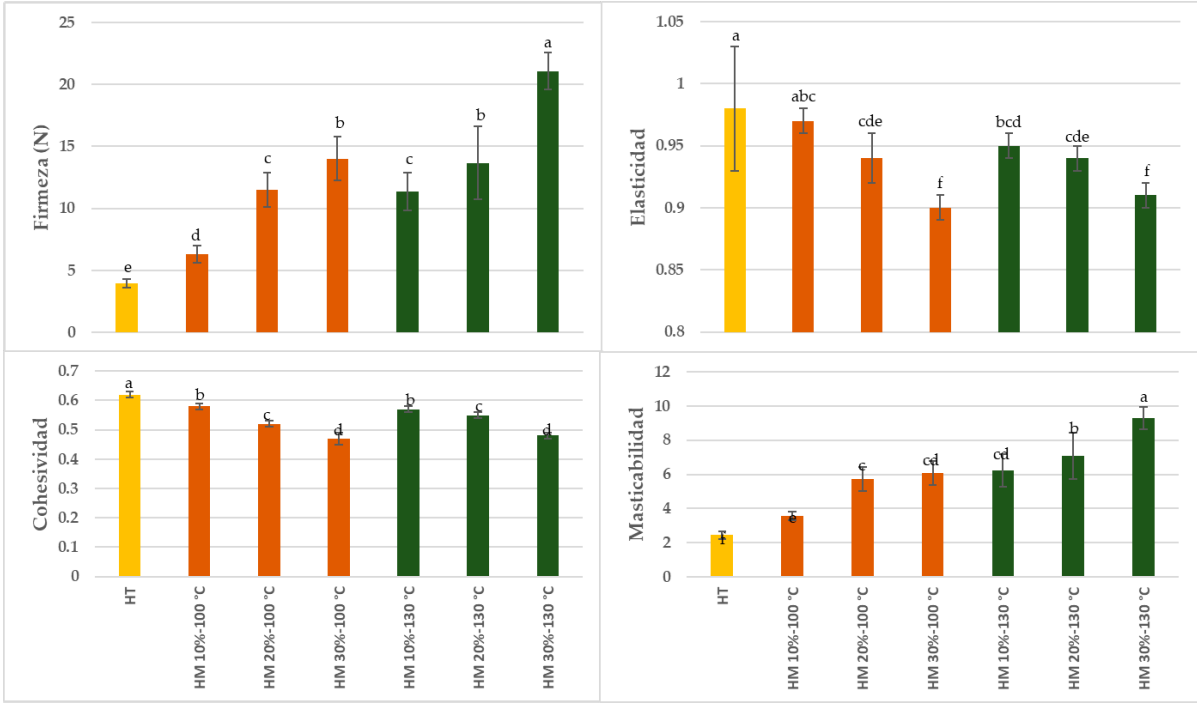


Figura 4. Perfil de textura del pan obtenido de HT (harina trigo) y mezclas de HT con HM (harina mijo) tratada térmicamente a 100 y 130 °C durante 30 min a niveles de sustitución del 10, 20 y 30 %.
Figure 3. Texture profile of bread obtained from HT (wheat flour) and mixtures of HT with HM (millet flour) heat-treated at 100 and 130 °C, at substitution levels of 10, 20 and 30 %.

rentes mezclas de HT con HM tratada a 100 y 130 °C a niveles de sustitución del 10, 20 y 30 %. En lo que respecta a firmeza la tendencia fue de incrementar a medida que aumentó el nivel de sustitución, este comportamiento fue más evidente cuando se utilizó HM (21.07 N) tratada a 130 °C y nivel de sustitución del 30 %. El valor más bajo de este parámetro fue el que se obtuvo en HT (3.97 N). Este mismo comportamiento fue observado en masticabilidad, sin embargo, los incrementos más importantes fueron los mostrados a niveles de sustitución del 20 y 30 % con HM (7.07 y 9.31, respectivamente) tratada a 130 °C y que mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al resto de mezclas de harinas. Un comportamiento contrario al observado en los dos parámetros mencionados anteriormente fueron elasticidad y cohesividad, coincidiendo también en que los valores más bajos observados fueron en la sustitución del 30 % con HM sin importar el tratamiento térmico a la que fue sometida.

La firmeza de la miga es uno de los atributos de textura que más ha llamado la atención, por la percepción de frescura del producto, en este caso pan, que nos brinda una estimación de la calidad de este. La textura y la palatabilidad de los productos de panadería son atributos muy importantes que difieren de un producto a otro. En el caso de la textura de la miga del pan, las propiedades mecánicas como firmeza y elasticidad son de las que más interesan y muy frecuentemente se trata de ligar estos parámetros con las características asociadas a la palatabilidad y masticabilidad mediante la adaptación de los más fundamentales métodos físicos de análisis (Hernández y Duran, 2012).

CONCLUSIONES

Las propiedades reológicas de las masas como fuerza y extensibilidad fueron afectadas por los niveles de sustitución de la harina de trigo. La fuerza de la masa disminuyó a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución con la harina de mijo tratada a 100 y 130 °C, sin embargo, en todos los casos fue mayor a la registrada por la harina de trigo. En la extensibilidad de las masas se observó lo contrario, incrementos muy pequeños que no mostraron diferencias significativas entre ellos, independientemente del nivel de sustitución y el tratamiento térmico.

El volumen específico es uno de los parámetros de calidad más importantes en productos de panificación, en este sentido, con la sustitución de harina de trigo con 10 % de harina de mijo tratada a 100 °C no se afectó marcadamente este parámetro, obteniéndose un pan con un volumen específico aceptable (4.19 cm^3/g), con valores cercanos al del pan elaborado con harina de trigo (control).

Otros parámetros de importancia considerados por los consumidores de productos de panificación son la firmeza y la masticabilidad, en este trabajo de investigación estas fueron afectadas por el porcentaje de sustitución de harina de trigo y el tratamiento térmico. Niveles más altos de sustitución (30 %) y tratamiento térmico de 130 °C incrementaron la firmeza y masticabilidad del pan afectando de manera negativa estos parámetros.

REFERENCIAS

AACC, 2000. Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. 10th Ed. The Association, St. Paul, MN, USA.

Methods 44-40.01, 46-13.01, 30-20.01, 08-01.01, 56-11.02, 76-21.02, 54-40.02, 10-10.03.

Balet, S., Guelpa, A., Fox, G. y Manley, M. 2019. Rapid Visco Analyser (RVA) as a Tool for Measuring Starch-Related Physiochemical Properties in Cereals: a Review. Food Analytical Methods 12:2344-2360. https://doi.org/10.1007/s12161-019-01581-w

Barak, S., Mudgil, D. y Khatkar, B.S. 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. LWT-Food Science and Technology (51) 211-217. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.011

Berton, B., Scher, J., Villieras, F. y Hardy, J. 2002. Measurement of hydration capacity of wheat flour: Influence of composition and physical characteristics. Powder Technology (128) 326-331. https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00168-7

Blazek, J. y Copeland, L. 2008. Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. Carbohydrate polymers (71) 380-387. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.010

Brandolini, A., Hidalgo, A. y Moscaritolo, S. 2008. Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. monococcum) whole meal flour. Journal of Cereal Science (47) 599-609. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.005

Demirkesen, I., Mert, B., Summu, G. y Sahin, S. 2010. Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations. Journal of Food Engineering 101(3): 329-336. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.017

Espinoza Silva, C.R. y Quispe Solano, M.A. 2013. Manual de tecnología de cereales y leguminosas. Universidad Nacional del Centro de Perú. https://maqsolano.files.wordpress.com/2014/04/manual-de-tecnologia-de-cereales.pdf

Gélinas, P., Mckinnon, C.M., Rodrigue, N. y Montpetit, D. 2001. Heating conditions and bread-making potential of substandard flour. Journal of Food Science (66) 627-632. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04612.x

Hasmadi, M., Siti Faridah, A., Salwa, I., Matanjun, P., Abdul Hamid, M. y Rameli, A.S. 2014. The effect of seaweed composite flour on the textural properties of dough and bread. Journal of Applied Phycology 26:1057-1062. https://doi 10.1007/s10811-013-0082-8

Haynes, L.C., Bettge, A.D. y Slade, L. 2009. Soft wheat and flour products methods review: Solvent retention capacity equation correction. Cereal Foods World, 54(4), 174-175. https://doi.org/10.1094/CFW-54-4-0174

Hernández, O.M. y Duran. O.D. 2012. Características reológcas del pan de agua producto autóctono de pamplona (Norte de Santander). Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 10(2): 61-74. Universidad de Pamplona. Colombia. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90326388001

Hidalgo García, M.A. 2014. Elaboración y aceptabilidad de pan con sustitución parcial de harina de zanahoria fortificado con zinc en niños de 6 años de edad. Institución educativa particular. Surco-Lima, 2013. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.050

Kieffer, R., Wieser, H., Henderson, M.H. y Graveland, A. 1998. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. Journal of Cereal Science, 27(1), 53-60. https://doi.org/10.1006/jcrs.1997.0136

Ktenioudaki, A., O'Shea, N. y Gallagher, E. 2013. Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of food processing: Brewer's spent grain and apple pomace. Journal of Food Engineering, 116(2), 362-368. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.005

Lei, F., Ji Chung, T., Cai Ling, S. y Chun, L. 2008. RVA and farinograph properties study on blends of resistant starch and wheat flour. Agricultural Science in China 7 (7) 812-822. https://doi:10.1016/S1671-2927(08)60118-2

Noorfarahzilah, M., Lee, J.S., Sharifudin, M.S., 2Mohd Fadzelly, A.B. y Hasmadi, M. 2014. Applications of composite flour in development of food products. MiniReview. International Food Research Journal 21(6): 2061-2074. http://www.ifrj.upm.edu.my

Posner, E.S. 2009. Wheat Flour Milling. En K. Khan and P.R.B.T.W. (Fourth E. Shewry (Eds.), American Associate of Cereal Chemists International (pp. 119-152). ISBN: 978-1-891127-55-7

Pyler, E.J. 1988. Cake baking technology. Baking science and technology (979-1027). Kansas City: Sosland Publishing. ISBN-10:0929005007

Rosentrater, K.A. y Evers, A.D. 2018. Kent's Technology of Cereals an Introduction for Students of Food Science and Agriculture (5th edition; W. E. Publishing, Ed.). Elsevier Ltd. ISBN: 9780081005323

Rieder, A., Holtekjølen, A.K., Sahlstrøm, S. y Moldestad, A. 2012. Effect of barley and oat flour types and sourdoughs on dough rheology and bread quality of composite wheat bread. Journal of Cereal Science, 55(1), 44-52. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.003

Russo, J.V. y Doe, C.A. 1970. Heat treatment of flour as an alternative to chlorination. International Journal of Food Science & Technology, 5(4), 363-374. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1970.tb01580.x

Shittu, T.A., Raji, A.O. y Sanni, L.O. 2007. Bread from composite cassava-wheat flour: I. Effect of baking time and temperature on some physical properties of bread loaf. Food Research International, 40(2), 280-290. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.012

Tadeu-Paraginski, R., Levien-Vanier, N., Berrios, J.J., De Oliveira, M. y Cardoso-Elias, M. 2014. Physicochemical and pasting properties of maize as affected by storage temperature. Journal of Stored Products Research (59) 209-214. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.02.010

Upadhyay, R., Ghosal, D. y Mehra, A. 2012. Characterization of bread dough: Rheological properties and microstructure. Journal of Food Engineering (109) 104-113. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.028

Vásquez, F. 2016. Tesis doctoral, Control y mejora de la panificación de masas bajas en harina de trigo. Universidad Politécnica de Valencia. Universidad Politécnica de Valencia. https://m.riunet.upv.es/handle/10251/65616?show=full

Vásquez Lara, F., Verdú Amat, S., Islas Rubio, A.R., Barat Baviera, J.M., Grau Meló, R. y Casillas Peñuelas, R. 2017. Efecto de la sustitución de harina de trigo con harina de avena, maíz y sorgo sobre las propiedades reológicas de la masa, texturales y sensoriales del pan. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, 71, 19-26. https://www.redalyc.org/journal/674/67452917003/html/

Vásquez Lara, F., Soto Padilla, D., Cordero Fernández, D., Granados Nevárez, M.C., Islas Rubio, A.R. y Verdú Amat, S.

2018. Utilización de harina de sorgo tratada térmicamente como una alternativa en la sustitución de harina de trigo en panificación. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 19(2), 267-280. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541013

Verdú, S., Vásquez, F., Ivorra, E., Sánchez, A.J., Barat, J.M. y Grau, R. 2015. Physicochemical effects of chia (*Salvia hispanica*) seed flour on each wheat bread-making process phase and product storage. Journal of Cereal Science, 65, 67-73. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.05.011

Wu, C., Liu, R., Huang, W., Rayas-Duarte, P., Wang, F. y Yao, Y. 2012. Effect of sourdough fermentation on the quality of Chinese Northen-style steamed breads. Journal of Cereal Science, 56 (2), 127-133. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.03.007

Zaidul, I.S.M., Yamauchi, H., Kim, S.J., Hashimoto, N. y Noda, T. 2007. RVA study of mixtures of wheat flour and potato starches with different phosphorus content. Food Chemistry (102) 1105-1111. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.056

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Differentiation of mezcales from four agave species using FT-MIR and multivariate statistical analysis

Diferenciación de mezcales de cuatro especies de agave usando FT-MIR y análisis estadístico multivariado

Rosa López-Aguilar[1], Emanuel Hernández-Núñez[2], Arturo Hernández Montes[1]*, Holber Zuleta Prada[3] and José Enrique Herbert Pucheta[4]

[1] Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México - Texcoco, CP 56230 Chapingo, Estado de México, México.
[2] Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida. Km. 6 antigua Carretera a Progreso, Cordemex, Yucatán, CP 97310, Mérida, México.
[3] Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México - Texcoco, CP 56230 Chapingo, Es-tado de México, México.
[4] Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Santo Tomás, 11340, Ciudad de México, México.

ABSTRACT

Fourier Transform Mid-Infrared (FT-MIR) spectroscopy and multivariate statistical analysis were used to differentiate mezcales elaborated with four agave species. The FT-MIR data matrix was subjected to spectral transformations using first and second derivatives. The Partial Least Squares (PLS)-Discriminant Analysis (DA) with the matrix transformed by the first and second derivative allowed the differentiation of mezcales, while Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis (OPLS-DA) was more robust when it was analyzed with second-derivative data. Pairwise comparisons by OPLS-DA allowed mezcales to be correctly discriminated, mainly between *Agave karwinskii* and *Agave potatorum* (Q^2 = 0.654 and p – value < 0.01; R^2Y = 0.985 and p-value < 0.01) and between *Agave angustifolia* and *Agave karwinskii* (Q^2 = 0.563 and p-value = 0.01; R^2Y = 0.989 and p-value = 0.01). FT-MIR spectrophotometry and the PLS-Regression (PLS-R) were applied to predict the ethanol percentage (% v/v) of mezcales collected in 2022, based on the PLS-R model previously run on samples evaluated in 2021.

Keywords: Mezcal; agave, discrimination; spectroscopy.

RESUMEN

Espectrofotometría Infrarroja en la región media con Transformada de Fourier (FT-MIR) y análisis estadístico multivariado fueron utilizados para diferenciar mezcales elaborado con cuatro especies de agave. La matriz de datos FT-MIR fue sometida a transformaciones espectrales mediante primera y segunda derivada. El Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) a partir de datos transformados con primera y segunda derivada permitió la diferenciación de mezcales. En tanto, el Análisis Discriminante mediante Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales (OPLS-DA) fue más robusto cuando se analizó con los datos de segunda derivada. Las comparaciones pareadas mediante OPLS-DA permitió la discriminación adecuada de los mezcales, principalmente entre *Agave karwinskii* y *Agave potatorum* (Q^2 = 0.654 and p-value < 0.01; R^2Y = 0.985 and p-value < 0.01) y entre *Agave angustifolia* y *Agave karwinskii* (Q^2 = 0.563 and p-value = 0.01; R^2Y = 0.989 and p-value = 0.01). La espectrofotometría FT-MIR y la Regresión PLS (PLS-R) lograron predecir el porcentaje de etanol (% v/v) en los mezcales colectados en 2022 con base en el modelo PLS-R previamente generado con muestras evaluadas en 2021.

Palabras clave: Mezcal; agave; discriminación; espectroscopía.

INTRODUCTION

Mezcal, one of México's emblematic drinks, is produced by the distillation of cooked and fermented agave juice (Espejel- García *et al*., 2019; Nolasco-Cancino *et al*., 2022). It can be produced with wild or cultivated maguey. Although the terms agave and maguey are used interchangeably, the term maguey refers to a wild plant and agave when it is cultivated (Hernández-López, 2019).

For the elaboration of mezcal, different species of mature agaves are used depending on the place of production, including *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* in Oaxaca (Vera-Guzmán *et al*., 2018), *Agave durangensis* in Durango (Barraza-Soto *et al*., 2014), *Agave salmiana* in San Luis Potosí (Godínez-Hernández *et al*., 2015), *Agave cupreata* in Guerrero and Michoacán (García-Mendoza, 2012), *Agave tequilana* in Zacatecas (López-Nava *et al*., 2012), and *Agave karwinskii* in Puebla and Oaxaca (Vázquez-Pérez *et al*., 2020). Despite the distribution of agaves throughout mexican territory, only nine states have the Denomination of Origin for mezcal (DOM) (Hernández-López, 2018). In addition to the aforementioned states, Tamaulipas and Guanajuato also have DOMs (Vera-Guzmán *et al*., 2010). Depending on the elaboration process, the Mexican normativity classifies the mezcales as artisanal, ancestral, and mezcal (Dirección General de Normas, 2016). The relevance of mezcal can be seen in its production volume, from 1 million liters in 2012 to 8 million in 2021 (COMERCAM, 2022), which means a sevenfold

*Author for correspondence: A. Hernández Montes
e-mail: ahernandezmo@chapingo.mx
Received: November 30, 2023
Accepted: April 1, 2024
Published: May 3, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2210

increase in 9 years. Therefore, it becomes an economically valuable product, together with the cultural, environmental, and technological impact that it generates in the production areas (Rios-Colín *et al*., 2022).

However, mezcal is a highly susceptible beverage to adulteration because it can be easily mixed with cheaper liquids (Esteki *et al*., 2018), which compromises its authenticity, quality, and value in the market, consequently increasing the risk to consumer health (Tabago *et al*., 2021). This leads to the proposal of strategies to monitor the safety of alcoholic beverages consumers, as it is estimated that approximately 40 to 50 % of the beverages consumed in Mexico are illegal and clandestine (Gaytán, 2018). In this context, new metabolomics-based approaches are being implemented to analyze the quality of spirits and their adulterations (Gougeon *et al*., 2018). This requires knowledge of two scientific fields such as analytical chemistry and multivariate statistics (Fernandez-Lozano *et al*., 2019).

Infrared (IR) spectroscopy is a non-destructive, sensitive, fast (30 samples/hour), powerful, environmentally friendly instrumental technique that is widely used to analyze spirits (Arslan *et al*., 2021; Lachenmeier, 2007; Yadav and Sharma, 2019). In beer, mid-IR (MIR) spectroscopy has been used to determine authenticity (Lachenmeier, 2007), evaluate quality parameters (Llario *et al*., 2006), and control sugar production during maceration (Almeida *et al*., 2018). In wine, compositional parameters (glucose, fructose, pH, volatile, and titratable acidity) have been evaluated by MIR spectroscopy (Cozzolino *et al*., 2011). Cavaglia *et al*. (2020) also used this technique to detect, monitor, and correct bacterial contamination in white wine process. Finally, the MIR technique was used to predict sensory attributes of South Australian geographical indication (GI) wines (Niimi *et al*., 2021).

In agave spirits, Fourier Transform Infrared (FTIR) with attenuated total reflection (ATR) spectroscopy has been used for the authentication and characterization of tequila (Lachenmeier *et al*., 2005; Mondragón-Cortez *et al*., 2022). On the other hand, in mezcales, FTIR spectroscopy with ATR has been implemented to evaluate adulterations (Quintero-Arenas *et al*., 2020). Despite the aforementioned economic and social importance of mezcal, studies using FTIR spectroscopy and multivariate statistical analysis are still scarce. In particular, there is a need to implement rapid and easy-to-use analytical techniques such as FTIR spectroscopy that provide reliable results for decision-making. Therefore, the aim of this research was to establish a model for the discrimination of mezcales according to agave species (*A. angustifolia*, *A. salmiana*, *A. potatorum*, and *A. karwinskii*) by infrared spectroscopy and multivariate statistical analysis. Furthermore, this study proposes the prediction of ethanol percentage (% v/v) by a PLS-R analysis, which could provide the basis for its quantification in a fast, simple, and reliable routine. Therefore, this study proposes a novel, previously unreported method to analyze this spirit beverage according to the agave species used in its production. In addition, it can be extrapolated to study the effect of other factors such as the process used (artisanal or ancestral process) or the effect by geographical origin.

MATERIAL AND METHODS

Experimental material

Bottles of mezcal came from producers located in Oaxaca, San Luis Potosí, and Puebla (Table 1). Fifteen of them (ID: 301, 310, 450, 460, 470, 580, 601, 630, 640, 690, 701, 710, 760, 790, and 920) were collected in 2021, and six (ID: 239, 245, 373, 688, 863 and 949) in 2022. The mezcales were made with the species *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*, *and Agave karwinskii*, which in turn comprised two elaboration processes: artisanal and ancestral. The experimental units for this study were mezcal bottles of 250 mL. The experiment was carried out in triplicate.

Determination of ethanol percentage

The ethanol percentage (% v/v), based on NMX-V-013-NORMEX-2019 (Dirección General de Normas, 2019)**,** was determined with a set of certified alcoholometers OIML-ISO-4801-NF-B-35-515 (Alla France, Chemillé, France), one with a measuring scale of 30 – 40 (% v/v) and another with a scale

Table 1. Set of mezcales used in the FT-MIR analysis and arranged according to the agave species, geographical origin, process, and state.
Tabla 1. Conjunto de mezcales usados en el análisis FT-MIR y arreglados de acuerdo a las especies de agave, origen geográfico, proceso, y estado.

ID	Agave species	Geographical origin	Process	State
301	*A. angustifolia*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
310	*A. angustifolia*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
450	*A. angustifolia*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
460	*A. potatorum*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
470	*A. angustifolia*	Valles centrales	Artisanal	Oaxaca
580	*A. angustifolia*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
601	*A. potatorum*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
630	*A. angustifolia*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
640	*A. angustifolia*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
690	*A. potatorum*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
701	*A. potatorum*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
710	*A. salmiana*	Centro-SLP[z]	Artisanal	SLP
760	*A. angustifolia*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
790	*A. angustifolia*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
920	*A. angustifolia*	Valle de Atlixco y Matamoros	Artisanal	Puebla
239	*A. potatorum*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
245	*A. potatorum*	Valles Centrales	Artisanal	Oaxaca
373	*A. angustifolia*	Valles centrales	Artisanal	Oaxaca
688	*A. angustifolia*	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca
863	*A. karwinskii*	Three regions[y]	Artisanal	Oaxaca
949	*A. karwinskii*	Sierra Sur	Artisanal	Oaxaca

[z] SLP: San Luis Potosí.
[y] Valles Centrales, Centro and Sierra Sur.

of 40 - 50 (% v/v), calibrated at 20 °C, with graduation of 0.10 and accuracy of 0.10.

FT-MIR spectroscopy

FT-MIR spectroscopy was performed with a spectrophotometer (Thermo Scientific™ Nicolet iS5, MA, USA) using a diamond crystal with ATR, the angle of incidence was 45°. Each spectrum was collected in absorbance mode, over the 650.00 - 4000.00 cm^{-1} range, with a resolution of 4 cm^{-1}. The temperature control was at 25 ± 1 °C. The sample (100 µL) was carefully placed on the diamond crystal to avoid air bubbles and immediately covered with the lid to reduce mezcal evaporation (Quintero-Arenas *et al*., 2020). Sixty-four scans were taken and the average for each mezcal was calculated using the OMNIC™ spectroscopy program (Thermo Scientific™, USA). Prior to multivariate analysis, the data were pre-processed and treated with spectral transformations. An overview of the treatments applied is shown in Figure 1.

Multivariable statistical models

Evaluation of mezcal by agave species based on FT-MIR spectroscopy

FT-MIR data matrices were subjected to unsupervised and supervised multivariate statistical procedures using MetaboAnalyst 5.0 software according to Pang *et al*. (2021). The unsupervised Principal Component Analysis (PCA) allowed the reduction of data dimensionality (Hu *et al*., 2015). Both OPLS-DA and PLS-DA supervised models were implemented to profile mezcales according to the species of agave used in their production. Spectra processing included normalization, transformation, and autoscaling (Chong *et al*., 2019; Van den Berg *et al*., 2006). Goodness-of-fit, denoted by R^2, and goodness-of-prediction, represented by Q^2, indicate the quality of each model (Dasenaki *et al*., 2019). PLS-DA and OPLS-DA were validated with 100 permutations at a 95 % confidence level (Herbert-Pucheta *et al*., 2021).

Determination of the ethanol percentage of mezcal based on FT-MIR spectroscopy

The determination of ethanol percentage (% v/v) was achieved by the PLS-R analysis. Model training was carried out at two stages, known as calibration and validation. Training involves correlating two matrices, X (composed of spectral information) and Y (composed of ethanol percentage data), using regression to generate a model for predicting the variable of interest. Prediction, also known as testing, was implemented to evaluate the PLS-R performance. Testing was carried out on a new set of mezcales, with the limitation that they had not been used previously in training. The values of coefficient of determination (R), both the root mean square error during calibration (RMSEC) and the root mean square error during prediction (RMSEP), and the ratio of prediction to deviation (RPD), defined as SD/RMSEP**,** made it possible to measure the PLS-R capability (Anjos *et al*., 2016; Esbensen, 2002; Quintero-Arenas *et al*., 2020). The model was developed using Unscrambler X version 10.3 software (Camo Software AS, Oslo, Norway).

RESULTS AND DISCUSSION

Discrimination of mezcal according to agave species by FT-MIR-ATR

The mezcal samples were subjected to FT-MIR spectroscopy with ATR in the mid-IR region, from 650-4000 cm^{-1} (Figure 2), to discriminate mezcal according to agave species. Although Silva *et al*. (2014) revealed that from 3627-2971 cm^{-1} was not useful for the multivariate statistical analysis and Lachenmeier *et al*. (2005) excluded the regions 1887-1447 and 3696 - 2971 cm^{-1}. In this study, just removing the 3110 to 3600 cm^{-1} region was enough to obtain robust results compared to the analysis of the whole region (analysis not shown).

Datasets obtained from the FT-MIR spectroscopy were exported and transformed using Unscrambler software. The transformations applied (Figure 1) included: baseline offset,

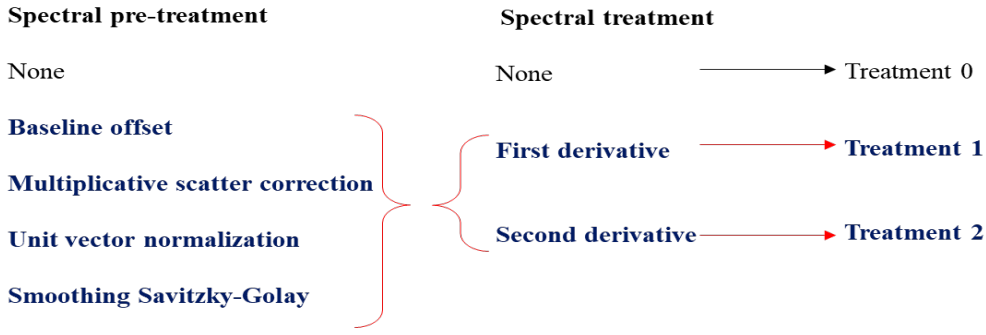


Figure 1. General overview of the implemented spectral transformations on the FT-MIR data matrix obtained from mezcales. Treatment zero did not include any transformation. Treatments one and two included all four pre-treatments (baseline offset, multiplicative scatter correction, unit vector normalization, and Savitzky-Golay smoothing). The difference was that treatment one was processed with the first derivative, and treatment two was analyzed with the second derivative.

Figura 1. Resumen general de las transformaciones espectrales implementadas sobre la matriz de datos FT-MIR obtenida de mezcales. El tratamiento cero no incluyó alguna transformación. Los tratamientos uno y dos comprendieron los cuatro pretratamientos (desplazamiento de línea base, corrección de dispersión multiplicativa, normalización de vectores unitarios y suavizado Savitzky-Golay). La diferencia fue que el tratamiento uno fue procesado con primera derivada y el tratamiento dos se analizó con segunda derivada.

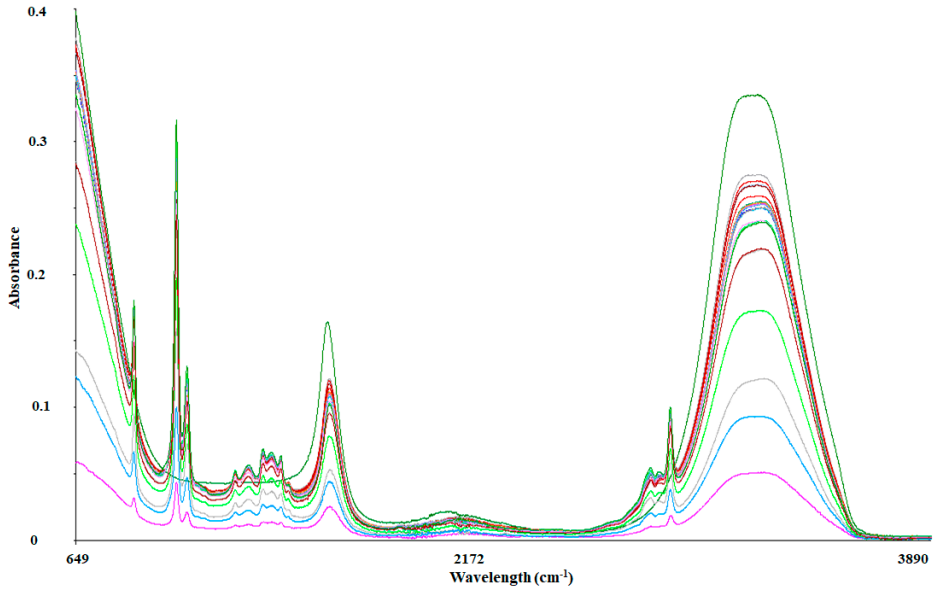


Figure 2. FT-MIR raw spectra obtained from mezcales before the spectral pre-treatment. This data matrix was subjected to multivariate analysis and its performance was evaluated.
Figura 2. Espectros crudos de FT-MIR obtenidos de mezcales antes del pretratamiento espectral. Esta matriz de datos se sometió a análisis multivariado y se evaluó su desempeño.

Multiplicative Scatter Correction (MSC), unit vector normalization, Savitzky-Golay smoothing with nine symmetry points, and finally the first (order one) and second (order two) derivatives of Savitzky-Golay with polynomial order two and six symmetry points.

In general, the elimination of baseline shifts helps to reveal hidden information and emphasize small spectral variations (Formosa *et al*., 2020). The MSC normalization was performed to correct each spectrum based on the mean value (average of all spectra) (Windig *et al*., 2008). The unit vector normalization and Savitzky-Golay smoothing were implemented to improve the signal by removing the noise of each spectrum (Haq *et al*., 2018; Wu *et al*., 2015).

Treatments 1 and 2 described in Figures 1 and 3 were evaluated and compared with the raw data using a multivariable approach, consisting of PCA, PLS-DA, and OPLS-DA routines. Figure 3 shows the plots of spectral data transformed by the first and second derivatives. Figure 3A, like Figure 3B, shows three regions, designed Region 1 from 1360 - 1766 cm^{-1}, Region 2 from 1908 - 2172 cm^{-1}, and Region 3 from 3361 - 3746 cm^{-1}, indicating the difference between the data of both treatments 1 and 2. These differences could be reflected in the multivariate analysis.

Figure 4 shows the loadings plots based on PCA of the FT-MIR data matrix of mezcales produced with *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana,* and *A. karwinskii*. Two principal components described 57.6 % of the spectral variation for FT-MIR raw data (Figure not shown); 51.3 % (treatment 1) and 27.9 % (treatment 2) for the pre-treated datasets (figures not shown). Although the spectral variation is greater for the FT-MIR raw data, it is suspicious for two main reasons. The first reason is that a sample of mezcal elaborated with *A. salmiana* is located inside the ellipse of *A. angustifolia*, and the second reason is related to the advantage of analyzing a pre-treated matrix since the spectral transformation is necessary to minimize or eliminate physical effects. Specifically, a derivation procedure is applied to eliminate additive and multiplicative effects, and in addition, both transformations remove the baseline of the spectra (Anjos *et al*., 2016).

Additionally, the trends in Figure 4 correspond to the distribution of the loadings, which shows a homogeneity of the values in Figure 4 (B and C), in contrast to Figure 4A. The distribution of the loadings around the four quadrants (I, II, III, and IV) allows us to obtain reliable and robust models (López-Aguilar *et al*., 2021). A similar pattern is observed in the loadings of the PLS-DA model for species (Figure 5), Figure 5F shows better behavior and homogeneous data of transformed spectra with second derivative than raw spectra (Figure 5D) of the FT-MIR spectroscopy.

However, the spectral variation represented by the scores plots in Figure 5C is only 23.3 % (component 1: 11.7 % and component 2: 11.6 %). Although the variation values are higher for the first derivative [Figure 5A; 42.8 % (component 1: 34.4 % and component 2: 8.4 %)] and raw data [Figure 5B; 37.5 % (component 1: 27.9 % and component 2: 9.6 %)], the scores plot shows a better separation for the second derivative data. The validation allowed us to evaluate the predictive power and accuracy (Ghosh *et al*., 2020) of the three models (raw spectra and transformed data with first and second derivatives) using leave one out-cross validation (LOO-CV) with 100 permutation routines and the value Q^2 denotes the ability of the analysis (Westerhuis *et al*., 2008).

The results (Figure 6A) showed that the PLS-DA analysis derived from the raw spectra indicated low and negative Q^2 values for the components, which means that the model is not prognostic at all or is overfitted (Szymańska *et al*., 2012). Furthermore, the observed *p*-value is not significant (Figure 6D; $p = 0.8$) by presenting 80 % of incorrect permutations, in contrast to other treatments, where the first and second derivative data had positive Q^2 values for the five components [Figure 6 (B and C)] and the performance during the permutation tests was significant for the two models [Figure

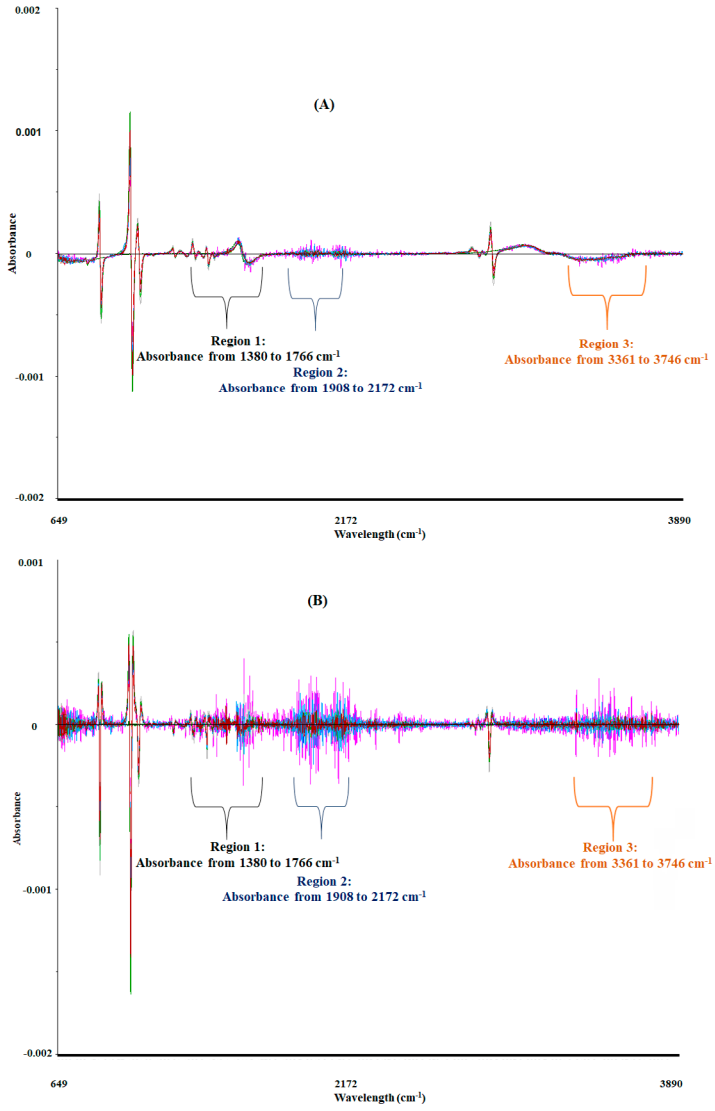


Figure 3. FT-MIR spectra of mezcales pre-treated with the first (A) and second (B) derivative of Savitzky-Golay (polynomial order two and six symmetry points). Both data sets were transformed by baseline offset, multiplicative scatter correction, unit vector normalization, and Savitzky-Golay smoothing with nine symmetry points. This data matrix was subjected to multivariate analysis and its performance was evaluated.

Figura 3. Espectros de FT-MIR de mezcales pre-tratados con filtro Savitzky-Golay en primera derivada (A) y segunda derivada (B) (orden polinomial dos y seis puntos de simetría). Ambos conjuntos de datos fueron transformados con desplazamiento de línea base, corrección de dispersión multiplicativa, normalización de vectores unitarios y suavizado Savitzky-Golay con nueve puntos de simetría. Esta matriz de datos se sometió a análisis multivariado y se evaluó su desempeño.

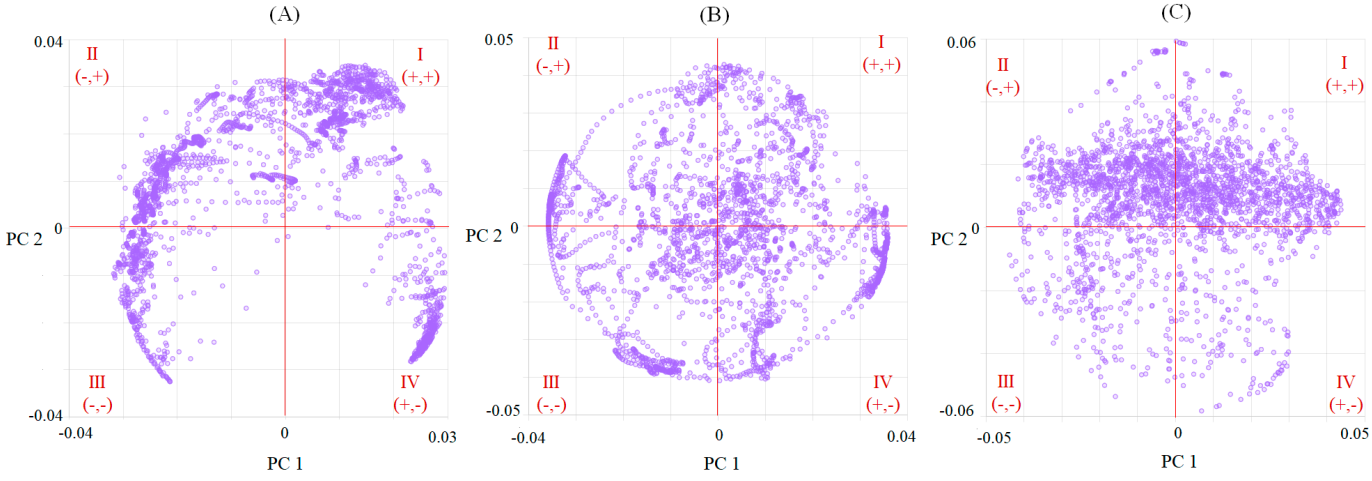


Figure 4. Loading plots of mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy and generated from Principal Component Analysis (PCA) on the raw (A), first derivative (B), and second derivative (C) data. The roman numerals indicate the quadrants of the plot (I, II, III, and IV).

Figura 4. Gráficos de loading de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR y generados del Análisis de Componentes Principales sobre los datos crudos (A), primera derivada (B), y segunda derivada (C). Los números romanos indican los cuadrantes del gráfico (I, II, III, y IV).

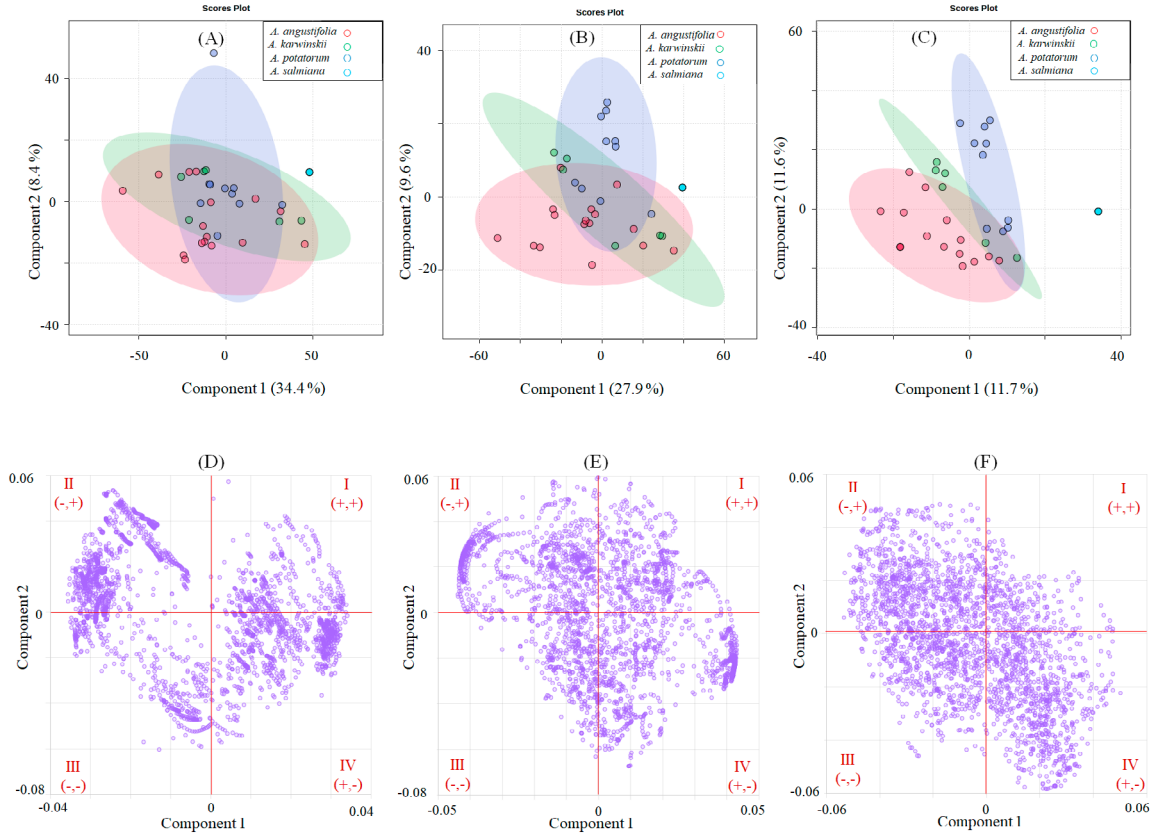


Figure 5. Partial Least Squares (PLS)-Discriminant Analysis (DA) of mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy. The scores and loadings plots were performed on the raw [(A) and (D)], first derivative [(B) and (E)], and second derivative [(C) and (F)] data. The roman numerals indicate the quadrants of the graph (I, II, III, and IV).

Figura 5. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR. Los gráficos de scores y de loadings se obtuvieron de los datos crudos [(A) and (D)], primera derivada [(B) and (E)], y segunda derivada [(C) and (F)]. Los números romanos indican los cuadrantes del gráfico (I, II, III, y IV).

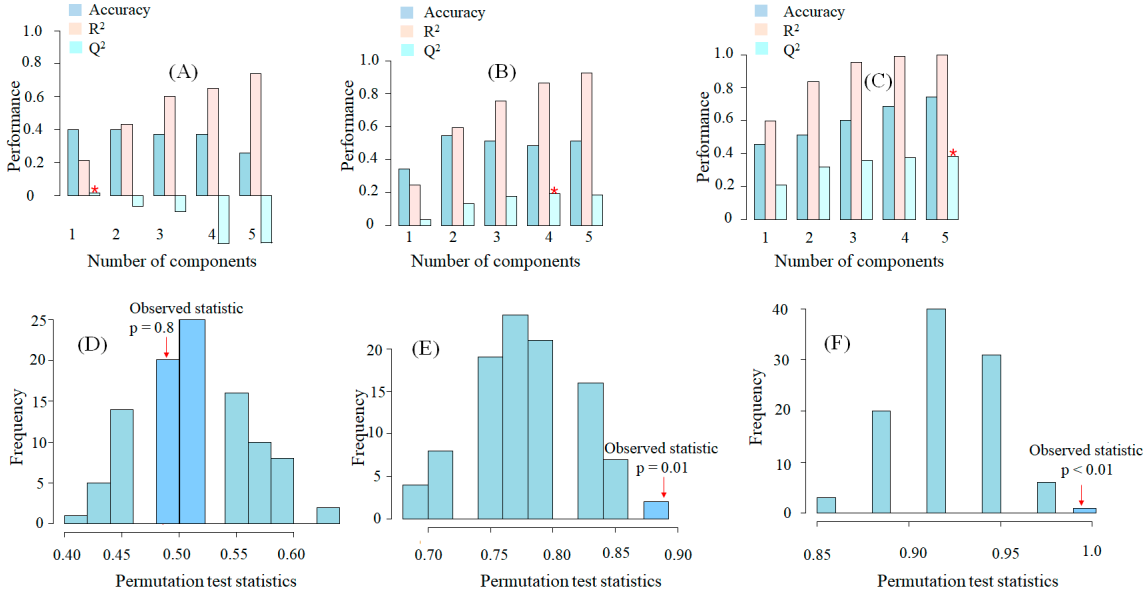


Figure 6. Performance of the Partial Least Squares (PLS)-Discriminant Analysis (DA) of mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy. Q^2 and *p*-value are based on the raw [(A) and (D), first derivative [(B) and (E)], and second derivative [(C) and (F)] data. The significance level of PLS-DA was set at 0.05.

Figura 6. Desempeño del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR. Q^2 y *p*-value se obtuvieron con base en los datos crudos [(A) y (D)], primera derivada [(B) y (E)], y segunda derivada [(C) y (F)]. La significancia del análisis OPLS-DA se estableció al 0.05.

Table 2. Overview performance of the OPLS-DA model based on Q^2 and *p*-value for the pairwise comparisons of *A. potatorum*, *A. angustifolia*, and *A. karwinskii* according to the applied transformation (first derivative or second derivative) on the FT-MIR spectral database.
Tabla 2. Resumen del desempeño del modelo OPLS-DA con base en Q^2 y *p*-value para las comparaciones pareadas de *A. potatorum*, *A. angustifolia*, y *A. karwinskii* de acuerdo con la transformación aplicada (primera derivada o segunda derivada) sobre la base de datos espectral FT-MIR.

Pretreatment	Statistical	*A. angustifolia* and *A. potatorum*	*A. karwinskii* and *A. potatorum*	*A. angustifolia* and *A. karwinskii*
Raw data	Q^2	-0.0858	0.134	0.149
	p-value	0.22	0.11	0.06
First derivative	Q^2	0.162	0.55	0.376
	p-value	0.1	0.02	0.02
Second derivative	Q^2	0.232	0.654	0.563
	p-value	0.04	< 0.01	0.01

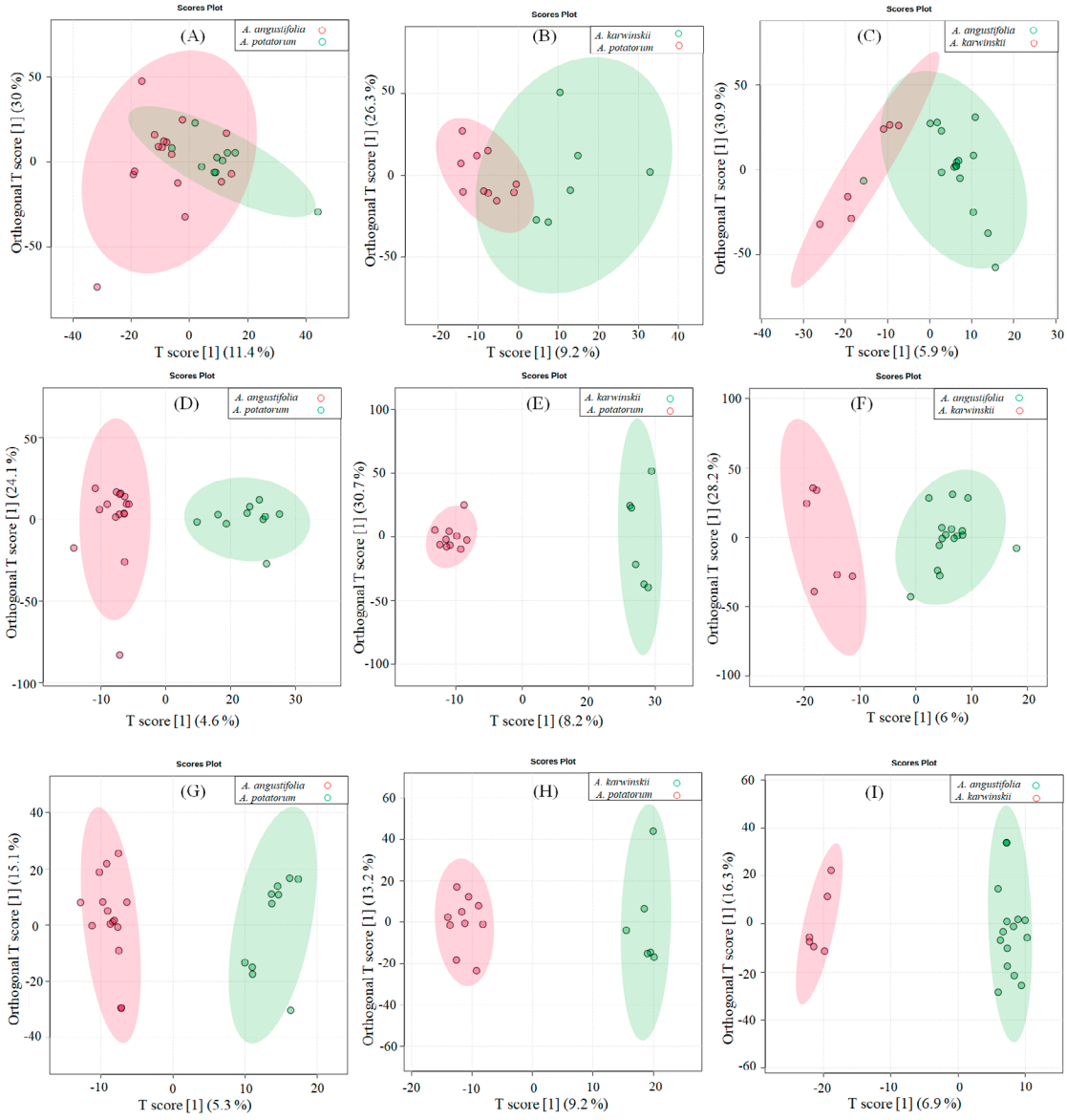


Figure 7. Score plots of mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy and generated from Orthogonal Partial Least Squares (OPLS)-Discriminant Analysis (DA) on the raw [(A), (B), and (C)], first derivative [(D), (E), and (F)], and second derivative [(G), (H), and (I)] data. Pairwise comparisons were performed to evaluate the discriminations between *A. angustifolia* and *A. potatorum* [(A), (D), y (G)], *A. karwinskii* and *A. potatorum* [(B), (E), y (H)] , and *A. angustifolia* and *A. karwinskii* [(C), (F), y (I)].
Figura 7. Gráficos de score de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR y generados del Análisis Discriminante mediante Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales sobre los datos crudos [(A), (B), y (C)], primera derivada [(D), (E), y (F)], y segunda derivada [(G), (H), y (I)]. Las comparaciones pareadas que se implementaron para evaluar discriminación fueron entre *A. angustifolia* y *A. potatorum* [(A), (D), y (G)], *A. karwinskii* y *A. potatorum* [(B), (E), y (H)], y *A. angustifolia* y *A. karwinskii* [(C), (F), y (I)].

6 (E and F)]. The permutation trials assume that there is no discrimination between the pair of randomly formed groups (Westerhuis *et al*., 2008).

Table 2 shows the capacity of the OPLS-DA on the FT-MIR spectra according to applied transformation. The three pairwise comparisons from *A. potatorum*, *A. angustifolia* and *A. salmiana* [Figure 7 (A, B, and C)] made with raw data, presented Q^2 values below 0.2 [Figure 8 (A, B, and C)], in addition, the p-values showed no significant differences in the analysis ($p \geq 0.05$). Apart from that, of the three comparisons made with data of the first derivative [Figure 7 (D, E, and F)], only the two comparisons between *A. karwinskii* and *A. potatorum* [Figure 7E], and *A. angustifolia* and *A. karwinskii* [Figure 7F], showed significance ($p = 0.02$) of the test for Q^2 [Figure 8 (E and F)].

The three pairwise comparisons between *A. angustifolia*, *A. potatorum* and *A. karwinskii* performed with the second derivative data matrix are also shown in Table 2 and Figure 7 (G, H, and I). Interestingly, the three comparisons presented Q^2 values statistically significant [Figure 8 (G, H, and I)], for example, the comparison between *A. angustifolia* and *A. potatorum* [Figure 7G] had a Q^2 value [Figure 8G] of 0.232 and a *p*-value of 0.04 ($p < 0.05$). Similarly, the discrimination between *A. karwinskii* and *A. potatorum* [Figure 7H] showed a Q^2 value [Figure 8H] of 0.654 and a *p*-value less than 0.01 ($p < 0.05$). Finally, the discrimination between *A. angustifolia* and *A. karwinskii* [Figure 7I] showed a Q^2 value [Figure 8I] of 0.563 and a *p*-value of 0.01.

Importantly, the lowest Q^2 value was for the discrimination between *A. angustifolia* and *A. potatorum* [Figure 8G]. This suggests that of the three pairs of comparisons, it is more difficult to distinguish mezcales between these species, possibly because they are highly commercialized species and the agaves are mixed during the cooking step**.** Mezcal production includes more than 50 species of agave, of these, 22 are the most used, and *A. angustifolia* becomes

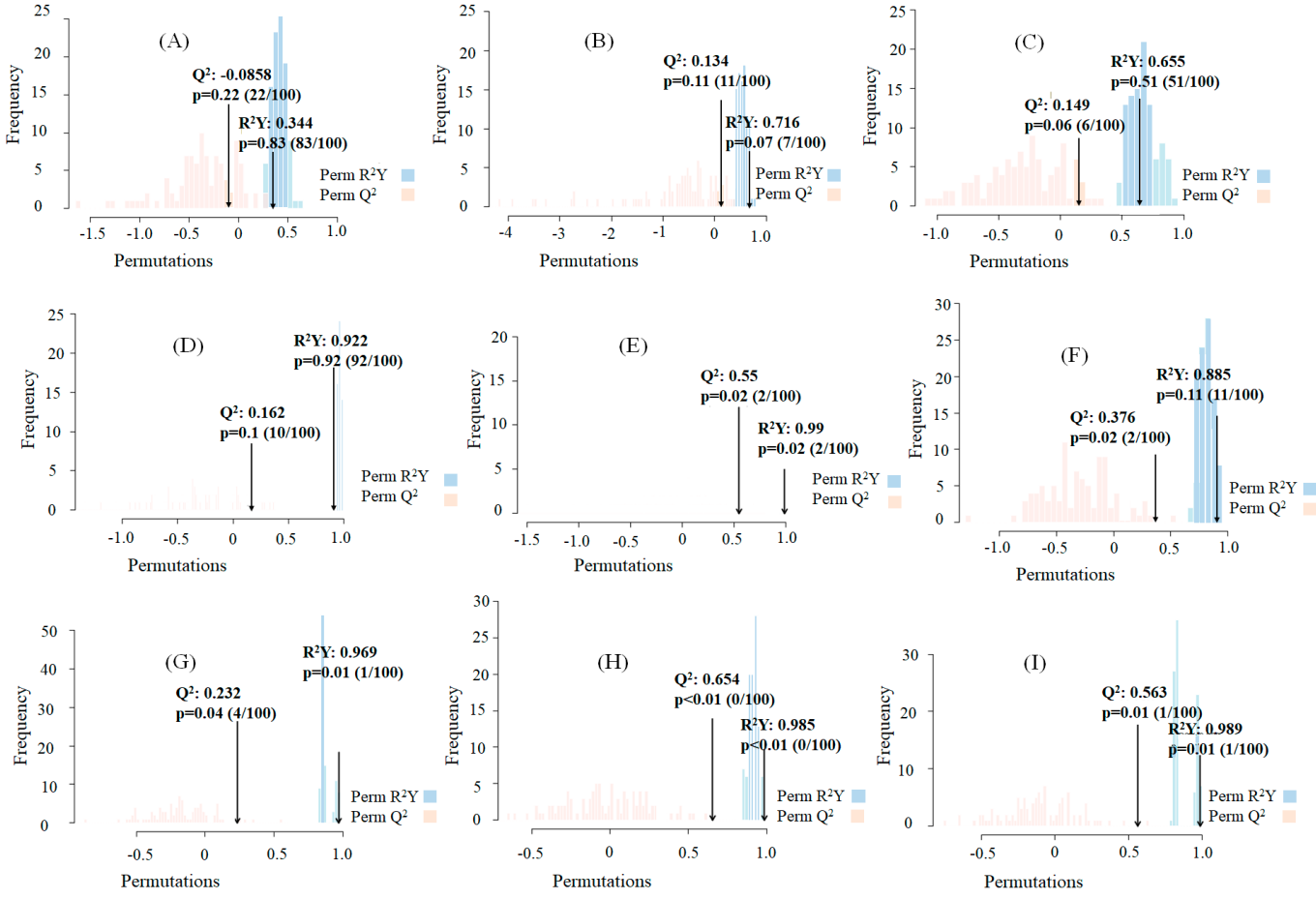


Figure 8. Orthogonal Partial Least Squares (OPLS)-Discriminant Analysis (DA) performance of the mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy. R^2Y, Q^2, and *p*-value are based on the raw [(A), (B), and (C)], first derivative [(D), (E), and (F)], and second derivative [(G), (H), and (I)] data. Pairwise comparisons to evaluate the discriminations between *A. angustifolia* and *A. potatorum* [(A), (D), and (G)], *A. karwinskii*, and *A. potatorum* [(B), (E), and (H)], and *A. angustifolia* and *A. karwinskii* [(C), (F), and (I)] were performed. The significance of the OPLS-DA was set at 0.05.

Figura 8. Desempeño del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Ortogonales de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR. R^2Y, Q^2, y *p*-value se obtuvieron con base en los datos crudos [(A), (B), y (C)], primera derivada [(D), (E), y (F)], y segunda derivada [(G), (H), y (I)]. Las comparaciones pareadas que se implementaron para evaluar discriminación fueron entre *A. angustifolia* y *A. potatorum* [(A), (D), y (G)], *A. karwinskii* y *A. potatorum* [(B), (E), y (H)], y *A. angustifolia* y *A. karwinskii* [(C), (F), y (I)]. La significancia del análisis OPLS-DA se estableció al 0.05.

important for presenting high yields (Castañeda-Nava *et al*., 2019; Sánchez-Gómez *et al*., 2022). Particularly, in localities from Sierra Sur, Oaxaca, the producers use 40 % of *A. angustifolia* and 15 % of *A. potatorum* of the total cultivated agave (Rios-Colín *et al*., 2022).

Determination of the ethanol percentage of mezcal based on FT-MIR spectroscopy

Training

The FT-MIR spectroscopy implemented in the 15 mezcales (Table 3) from 2021, allowed the calibration and validation of the ethanol percentage (% v/v) experimentally obtained by a PLS-R analysis, which is widely used for the construction of models that estimate the content of a compound of interest (Silva *et al*., 2014).

The MIR region used to calibrate and validate the ethanol percentage (% v/v), which in turn ranged from 1500 to 1700 cm^{-1} (Figure 9A), was subjected to a spectral transformation with the Savitzky-Golay first derivative of polynomial order two, and six symmetry points (Figure 9B). The infrared regions that have been evaluated were those corresponding to 1045 - 1086 cm^{-1} (Debebe *et al*., 2017) and three jointly evaluated regions comprising 663 - 1292, 1920 - 2236, and 2864 - 3057 cm^{-1} (Anjos *et al*., 2016), but no robust prediction models were found when these spectroscopic regions were evaluated in mezcal.

The R^2 values in the calibration and validation of the PLS-R analysis were 0.98 and 0.81, respectively (Table 4). The RMSEC and RMSEP values were 0.41 and 1.68, which indicate the performance of the model with acceptable prediction values. Finally, the RPD ratios were 9.03 and 2.29, respectively. The behavior of the mezcal samples during calibration and validation is shown in Figure 10 and Table 5. It can also be seen that samples 601, 640 and 690, were distributed far from the rest of the samples during validation, which means that they were the ones that showed the highest variation between the estimated and the reference values (differences of 4.5, 2.1, and 2.6, respectively). Therefore, these three samples were the ones that contributed the most to the RMSEP values (1.68). It is important to highlight the good predictive capacity of samples 301 and 701, whose differences between the calibration and validation of the ethanol percentage were zero for both mezcales.

Testing

The PLS-R model applied to the FT-MIR data matrix of the mezcales analyzed in 2021, was used to predict the ethanol percentage (% v/v) of a set of samples obtained in 2022 (Table 6) and subjected to FT-MIR analysis. The region eva-

Table 3. FT-MIR spectroscopy data matrix of mezcales obtained in 2021, along with the corresponding experimental ethanol percentage (NMX-V-013-NORMEX-2019), to generate a PLS-R model that allows the prediction of the ethanol percentage (% v/v).
Tabla 3. Matriz de datos de espectroscopía FT-MIR de mezcales obtenidos en 2021 junto con el correspondiente porcentaje de etanol experimental (NMX-V-013-NORMEX-2019) para generar un modelo PLS-R que permita la predicción del porcentaje de etanol (% v/v).

Mezcal	Ethanol[z]	Absorbance[y]				
		1500.35[x]	1500.83	1502.31	....	1700.91
301	46.7	0.04	0.04	0.03		0.04
310	41.9	0.04	0.04	0.04		0.05
450	40.6	0.04	0.04	0.04		0.05
470	46.0	0.03	0.03	0.03		0.04
580	38.2	0.04	0.04	0.04		0.05
601	48.2	0.03	0.03	0.03		0.03
630	46.3	0.04	0.04	0.03		0.05
640	46.8	0.04	0.04	0.04		0.04
690	48.0	0.04	0.04	0.04		0.05
701	48.2	0.03	0.03	0.03		0.04
710	39.8	0.04	0.04	0.04		0.05
790	47.1	0.04	0.04	0.04		0.05
460	40.4	0.04	0.04	0.04		0.05
760	45.0	0.04	0.04	0.04		0.05
920	50.0	0.03	0.03	0.03		0.04

[z] Experimental ethanol percentage (% v/v).
[y] Absorbance gained by FT-MIR spectroscopy of mezcales in 2021.
[x] Wavenumber (cm^{-1}) that corresponds to the FT-MIR absorption region.

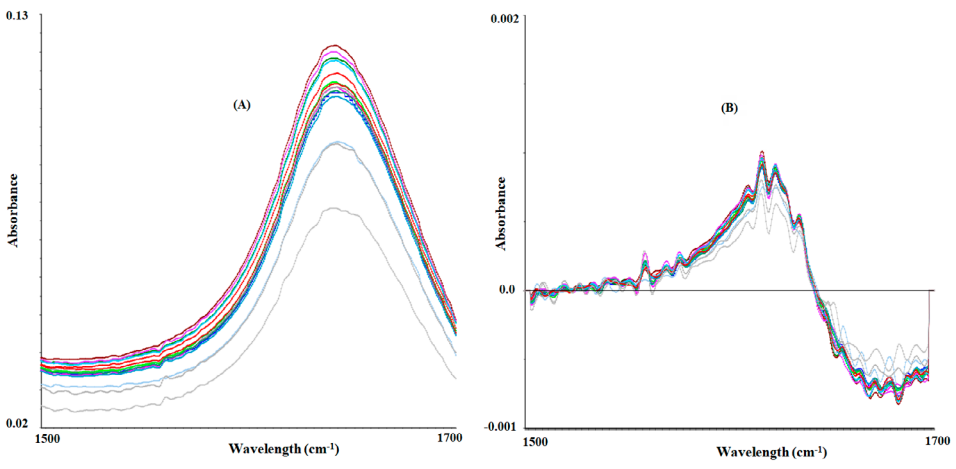


Figure 9. FT-MIR region from 1500 to 1700 cm^{-1} was used during training to predict the ethanol percentage (% v/v) of the mezcales obtained in 2021. The regions for the raw (A) and transformed (first derivative and smoothing with six symmetry points) (B) data are also shown.
Figura 9. Región FT-MIR de 1500 a 1700 cm^{-1} usada durante el entrenamiento para predecir el porcentaje de etanol (% v/v) de los mezcales obtenidos en 2021. También se presentan las regiones para los datos crudos (A) y transformados (primera derivada y suavizado de seis puntos de simetría) (B).

Table 4. Calibration and validation values of the PLS-R model in the 1500 to 1700 cm^{-1} wavelength region (FT-MIR), implemented in mezcales obtained in 2021.
Tabla 4. Valores de calibración y validación del modelo PLS-R sobre la región de longitud de onda de 1500 a 1700 cm^{-1} (FT-MIR), implementada en mezcales obtenidos en 2021.

Calibration			Validation		
R^2	RMSEC	RPD	R^2	RMSEP	RPD
0.98	0.41	9.03	0.81	1.68	2.29

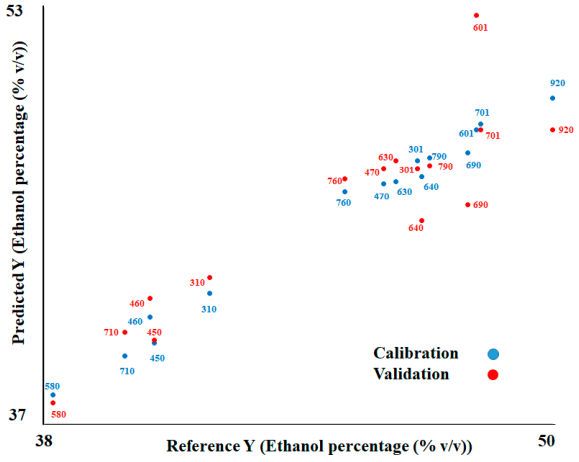


Figure 10. PLS-R model of mezcales subjected to FT-MIR spectroscopy and performed in the 1500 to 1700 cm^{-1} wavelength region. The PLS-R model for the calibration is shown with blue circles and letters, and the PLS-R model for the validation is shown with red circles and letters.
Figura 10. Modelo PLS-R de mezcales sometidos a espectroscopía FT-MIR y evaluado sobre la región de número de onda de 1500 a 1700 cm^{-1}. El modelo PLS-R para la calibración se representa con círculos y letras azules, y el modelo PLS-R para validación se indica con círculos y letras rojas.

luated during testing (Figure 11A) was the same as that used during training (1500-1700 cm^{-1}), which was also subjected to a spectral transformation with the Savitzky-Golay first derivative of polynomial order two, and six symmetry points (Figure 11B).

The prediction of the ethanol percentage (% v/v) for the new set of samples obtained in 2022 (Table 7) and subjected to FT-MIR analysis in triplicate, based on the PLS-R model performed with the samples evaluated in 2021, allowed us to obtain the ethanol percentage in an approximate way. For example, samples 373-1 and 688-1 showed the highest difference between the reference value and predicted value (8.3 y 5.8 %), but it is also important to highlight that samples 245-1 and 863-3 showed the lowest difference value (0.6 and 0.7 %, respectively). As a result, the RMSEP and R^2 values were 2.32 and 0.55, respectively, which showed an opposite behavior to that obtained in training, since the RMSP was greater and the R^2 was lower. Moreover, the RPD was 1.27 which is lower than the value obtained in the validation (2.29); since the RPD indicates the predictability of a model (Kamruzzaman, 2021), then high RPD values are required.

Despite the behavior observed in the prediction (three samples presented the highest dissimilarity between the estimated and the reference value), this proposal can be

Table 5. Predicted ethanol percentage during the training of the PLS-R model based on the FT-MIR data matrix of the mezcales obtained in 2021.
Tabla 5. Porcentaje de etanol predictivo durante el entrenamiento del modelo PLS-R con base en la matriz de datos FT-MIR de los mezcales obtenidos en 2021.

Mezcal	Reference Y_1	Predicted Y_2	Predicted Y_3	Difference$_1$	Difference$_2$
301	46.8	47.1	46.8	0.3	0
310	41.9	42	42.6	0.1	0.7
450	40.6	40.1	40.2	0.5	0.4
470	46	46.2	46.8	0.2	0.8
580	38.2	38.1	37.8	0.1	0.4
601	**48.2**	**48.3**	**52.7**	**0.1**	**4.5**
630	46.3	46.3	47.1	0	0.8
640	**46.9**	**46.5**	**44.8**	**0.4**	**2.1**
690	**48**	**47.4**	**45.4**	**0.6**	**2.6**
701	48.3	48.5	48.3	0.2	0
710	39.9	39.6	40.5	0.3	0.6
790	47.1	47.2	46.9	0.1	0.2
460	40.5	41.1	41.8	0.6	1.3
760	45.1	45.9	46.4	0.8	1.3
920	50	49.5	48.3	0.5	1.7

Reference Y_1: indicates the experimental ethanol percentage (reported as % v/v).
Predicted Y_2: the ethanol percentage gained during the calibration of the PLS-R model (reported as % v/v).
Predicted Y_3: the ethanol percentage gained during the validation of the PLS-R model (reported as % v/v).
Difference$_1$ = absolute value of the subtraction of the Predicted Y_2 from Reference Y_1.
Difference$_2$ = absolute value of the subtraction of the Predicted Y_3 from Reference Y_1.

Table 6. Data matrix of the FT-MIR spectroscopy, performed in mezcales obtained in 2022, along with the corresponding experimental ethanol percentage (NMX-V-013-NORMEX-2019) to generate a PLS-R model that allows the prediction of the ethanol percentage (% v/v).
Tabla 6. Matriz de datos de la espectroscopía FT-MIR realizada en mezcales obtenidos en 2022 junto con el correspondiente porcentaje de etanol experimental (NMX-V-013-NORMEX-2019) para generar un modelo PLS-R que permita la predicción del porcentaje de etanol (% v/v).

Mezcal	Ethanol[z]	Absorbance[y]				
		1500.35[x]	1500.83	1502.28	....	1700.91
239-1	47.0	0.04	0.04	0.04		0.05
239-2	47.1	0.04	0.04	0.04		0.05
239-3	47.4	0.04	0.04	0.04		0.05
245-1	46.2	0.04	0.04	0.04		0.05
245-2	46.6	0.04	0.04	0.04		0.05
245-3	46.6	0.04	0.04	0.04		0.04
373-1	49.3	0.04	0.04	0.04		0.05
373-2	49.2	0.04	0.04	0.04		0.05
373-3	49.4	0.01	0.01	0.01		0.01
688-1	49.4	0.04	0.04	0.04		0.05
688-2	49.4	0.04	0.04	0.04		0.04
688-3	49.4	0.04	0.04	0.03		0.04
863-1	39.9	0.04	0.04	0.04		0.05
863-2	39.6	0.02	0.02	0.02		0.03
863-3	40.0	0.04	0.04	0.04		0.05
949-1	48.9	0.03	0.03	0.03		0.04
949-2	49.1	0.04	0.04	0.04		0.04
949-3	49.3	0.03	0.03	0.03		0.04

[z] Experimental ethanol percentage (% v/v).
[y] Absorbance gained by FT-MIR spectroscopy of mezcales in 2022.
[x] Wavenumber (cm^{-1}) that corresponds to the FT-MIR absorption region.

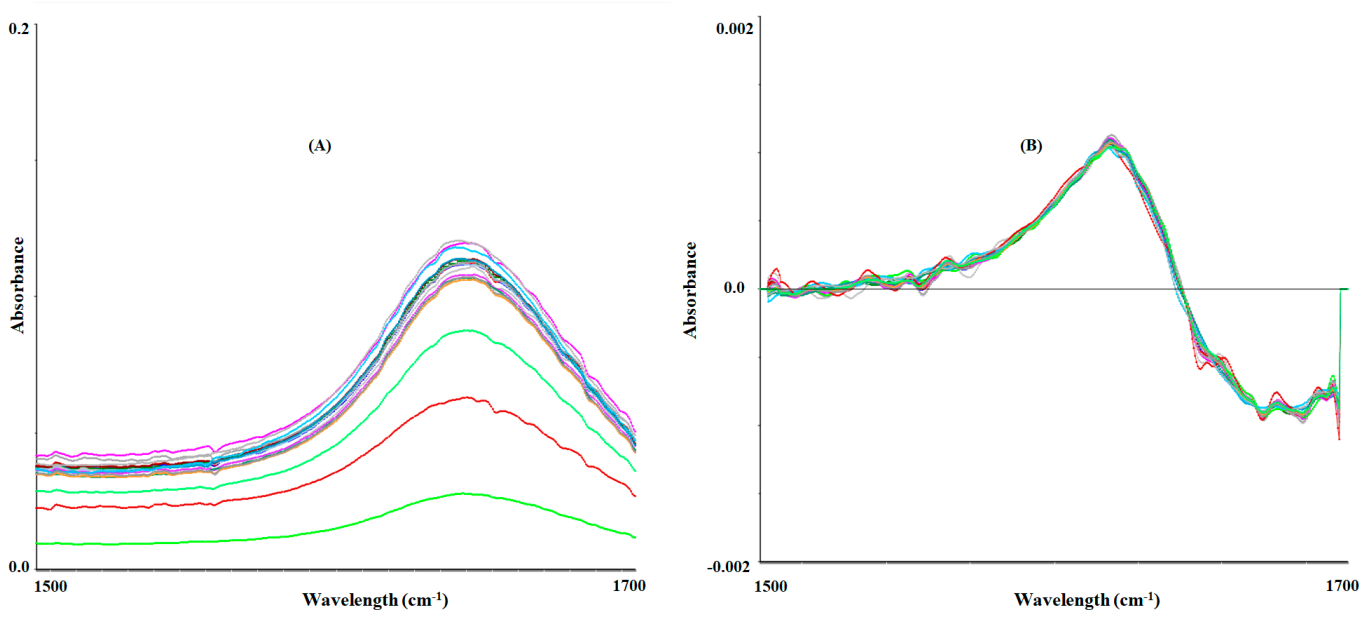


Figure 11. FT-MIR region from 1500 to 1700 cm^{-1} was used during the testing step, to predict the ethanol percentage (% v/v) of the mezcales obtained in 2022. The regions for the raw (A) and transformed (first derivative and smoothing with six symmetry points) (B) data are also shown.
Figura 11. Región FT-MIR de 1500 a 1700 cm^{-1} usada durante la etapa de prueba para predecir el porcentaje de etanol (% v/v) de los mezcales obtenidos en 2022. También se presentan las regiones para los datos crudos (A) y transformados (primera derivada y smoothing de seis puntos de simetría) (B).

Table 7. Predicted ethanol percentage (% v/v) at the testing step of the PLS-R model based on the FT-MIR data matrix of the mezcales obtained in 2022.
Tabla 7. Porcentaje de etanol (% v/v) predictivo en la etapa de prueba, del modelo PLS-R con base en la matriz de datos FT-MIR de los mezcales obtenidos en 2022.

Mezcal	Reference Y	Predicted Y	Difference
239-1	47	44.6	2.4
239-2	47.1	44.4	2.7
239-3	47.4	44.4	3.0
245-1	**46.2**	**46.8**	**0.6**
245-2	46.6	44.5	2.1
245-3	46.6	48.1	1.5
373-1	*49.3*	*41.0*	*8.3*
373-2	49.2	46.6	2.6
373-3	49.4	47.3	2.1
688-1	*49.4*	*43.6*	*5.8*
688-2	49.4	46.7	2.7
688-3	49.4	48.4	1.0
863-1	39.9	40.9	1.0
863-2	39.6	38.4	1.2
863-3	**40.0**	**39.3**	**0.7**
949-1	48.9	46.6	2.3
949-2	49.1	45.3	3.8
949-3	49.3	46.1	3.2

Reference Y: indicates the experimental ethanol percentage (reported as % v/v).
Predicted Y: the ethanol percentage gained during the prediction based on the PLS-R model performed with samples obtained in 2021 (reported as % v/v).
Difference = absolute value of the subtraction of Predicted Y from Reference Y.

the basis for determining the ethanol percentage (% v/v) by FT-MIR. This technique is a simple, fast, accurate, reliable, and viable alternative compared to traditional methods such as GC or densitometry which are more laborious (Debebe *et al*., 2017; Quintero-Arenas *et al*., 2020).

CONCLUSIONS

The PLS-DA with transformed data by both first ($p = 0.01$) and second ($p < 0.01$) derivatives, allowed the differentiation of mezcales produced from *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*, and *Agave karwinskii*, while OPLS-DA was more robust when analyzed with second-derivative data. Pairwise comparisons by OPLS-DA, allowed us to discriminate the mezcales between *A. angustifolia* and *A. potatorum* ($Q^2 = 0.232$, p-value = 0.04; $R^2Y = 0.969$, p-value = 0.01), *A. karwinskii* and *A. potatorum* ($Q^2 = 0.654$, p-value < 0.01; $R^2Y = 0.985$, p-value < 0.01), and *A. angustifolia* and *A. karwinskii* ($Q^2 = 0.563$, p-value = 0.01; $R^2Y = 0.989$, p-value = 0.01). The FT-MIR and multivariate analysis allowed the prediction of the ethanol percentage (% v/v) of the mezcales obtained in 2022, based on the PLS-R model previously run on the samples evaluated in 2021. During training, the R^2 values in the calibration and validation of the PLS-R analysis were 0.98 and 0.81, respectively. The RMSEC and RMSEP coefficients were 0.41 and 1.68, respectively. However, in testing, the behavior was the opposite, since the R^2 value (0.55) was lower and the RMSEP was higher (2.08). Finally, although we declare that the capacity of the PLS-R model was acceptable, it can be the basis for generating new ones, as more samples will be analyzed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CONAHCyT for its financial support for the graduate scholarship No. 733574 granted to Rosa López Aguilar.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

Almeida, F.S., de Andrade Silva, C.A., Lima, S.M., Suarez, Y.R., and da Cunha Andrade, L.H. 2018. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. Food Chemistry. 263, 112-118.

Anjos, O., Santos, A.J.A., Estevinho, L.M., and Caldeira, I. 2016. FTIR–ATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. Food Chemistry. 205, 28-35.

Arslan, M., Tahir, H.E., Zareef, M., Shi, J., Rakha, A., Bilal, M., Xiaowei, H., Zhihua, L., and Xiaobo, Z. 2021. Recent trends in quality control, discrimination and authentication of alcoholic beverages using nondestructive instrumental techniques. Trends in Food Science & Technology. 107, 80-113.

Barraza-Soto, S., Domínguez-Calleros, P.A., Montiel-Antuna, E., Díaz-Vásquez, M., and Návar-Chaidez, J. 2014. La producción de mezcal en el municipio de Durango, México. Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. 10(6), 65-74.

Castañeda-Nava, J.J., Rodríguez-Domínguez, J.M., Camacho-Ruiz, R.M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., and Gutiérrez-Mora, A. 2019. Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. Flora. 255, 18-23.

Cavaglia, J., Schorn-García, D., Giussani, B., Ferré, J., Busto, O., Aceña, L., Mestres, M., and Boqué, R. 2020. ATR-MIR spectroscopy and multivariate analysis in alcoholic fermentation monitoring and lactic acid bacteria spoilage detection. Food Control. 109, 106947.

Chong, J., Wishart, D.S., and Xia, J. 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. Current Protocols in Bioinformatics. 68(1).

COMERCAM. 2022. Informe estadístico 2022.

Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., and Smith, P. 2011. Feasibility study on the use of attenuated total reflectance mid-infrared for analysis of compositional parameters in wine. Food Research International. 44(1), 181-186.

Dasenaki, M.E., Drakopoulou, S.K., Aalizadeh, R., and Thomaidis, N.S. 2019. Targeted and untargeted metabolomics as an enhanced tool for the detection of pomegranate juice adulteration. Foods. 8(6), 212.

Debebe, A., Anberbir, A., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B.S., Asfaw, A., Asfaw, N., and Retta, N. 2017. Alcohol determination in distilled alcoholic beverages by liquid phase Fourier transform mid-infrared and near-infrared spectrophotometries. Food Analytical Methods. 10(1), 172-179.

Dirección General de Normas, 2016. NOM-070-SCFI. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.

Dirección General de Normas, 2019. NMX-V-013-NORMEX-Bebidas alcohólicas-Determinación del contenido alcohólico.

Esbensen, H.K. 2002. Multivariate data analysis- In practice. An introduction to multivariate data analysis and experimental design. USA.

Espejel-García, A., Barrera-Rodríguez, A., Ramírez-García, A.G., and Cuevas-Reyes, V. 2019. Innovación en la cadena agroindustrial de mezcal en tres municipios en Oaxaca, México. Revista Venezolana de Gerencia, 24(2): 188-209.

Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., and Vander Heyden, Y. 2018. A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. Food Control. 93, 165-182.

Fernandez-Lozano, C., Gestal-Pose, M., Pérez-Caballero, G., Revilla-Vázquez, A.L., and Andrade-Garda, J.M. 2019. Multivariate classification techniques to authenticate mexican commercial spirits. Quality Control in the Beverage Industry. 17, 259-287.

Formosa, J.P., Lia, F., Mifsud, D., and Farrugia, C. 2020. Application of ATR-FT-MIR for tracing the geographical origin of honey produced in the Maltese Islands. Foods. 9, 710.

García-Mendoza, A. 2012. México, país de magueyes. La Jornada. 53.

Gaytán, M.S. 2018. The perils of protection and the promise of authenticity: Tequila, mezcal, and the case of NOM 186. Journal of Rural Studies. 58, 103-111.

Ghosh, T., Zhang, W., Ghosh, D., and Kechris, K. 2020. Predictive modeling for metabolomics data. Methods in Molecular Biology. 2104, 313-336.

Godínez-Hernández, C.I., Aguirre-Rivera, J.R., Juárez-Flores, B.I., Ortiz-Pérez, M.D., and Becerra-Jiménez, J. 2015. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente. 22(1), 59–72.

Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., and Richard, T. 2018. Wine analysis and authenticity using 1H-NMR metabolomics data: application to Chinese wines. Food Analytical Methods. 11(12), 3425-3434.

Haq, Q.M.I., Mabood, F., Naureen, Z., Al-Harrasi, A., Gilani, S.A., Hussain, J., Jabeen, F., Khan, A., Al-Sabari, R.S.M., Al-khanbashi, F.H.S., Al-Fahdi, A.A.M., Al-Zaabi, A.K.A., Al-Shuraiqi, F.A.M., and Al-Bahaisi, I.M. 2018. Application of reflectance spectroscopies (FTIR-ATR & FT-NIR) coupled with multivariate methods for robust in vivo detection of begomovirus infection in papaya leaves. Spectrochimica Acta. 198, 27-32.

Herbert-Pucheta, J.E., Lozada-Ramírez, J.D., Ortega-Regules, A.E., Hernández, L.R., and Anaya de Parrodi, C. 2021. Nuclear magnetic resonance metabolomics with double pulsed-field-gradient echo and automatized solvent suppression spectroscopy for multivariate data matrix applied in novel wine and juice discriminant analysis. Molecules. 26(14), 4146.

Hernández-López, J. de J. 2018. El mezcal como patrimonio social: de indicaciones geográficas genéricas a denominaciones de origen regionales. Em Questão. 24(2), 404.

Hernández-López, J. de J. 2019. Mexican mezcales: The importance of their protection as social heritage. Revista de Antropologia. 20(2), 179-205.

Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., and Hardie, J.W. 2015. Proton nuclear magnetic resonance-spectroscopic discrimination of wines reflects genetic homology of several different grape (*V. vinifera* L.) cultivars. PLoS One. 10(12), e0142840.

Kamruzzaman, M. 2021. Chemical imaging in food authentication. Food Authentication and Traceability. 131-161.

Lachenmeier, D.W. 2007. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. Food Chemistry. 101(2), 825-832.

Lachenmeier, D.W., Richling, E., G. López, M., Frank, W., and Schreier, P. 2005. Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6), 2151-2157.

Llario, R., Iñón, F.A., Garrigues, S., and De La Guardia, M. 2006. Determination of quality parameters of beers by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. Talanta. 69(2), 469-480.

López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., and Herbert-Pucheta, J.E. 2021. Comparative NMR metabolomics profiling between mexican ancestral & artisanal mezcals and industrialized wines to discriminate geographical origins, Agave species or grape varieties and manufacturing processes as a function of their quality attributes. Foods. 10(1), 157.

López-Nava, G., Martínez-Flores, J.L., Cavazos-Arroyo, J., and Moreno-Mayett, Y. 2012. La cadena de suministro del mezcal del estado de Zacatecas situación actual y perspectivas de desarrollo. Contaduría y Administración. 59(2), 227-252.

Mondragón-Cortez, P., Herrera-López, E., Arriola-Guevara, E., and Guatemala-Morales, G. 2022. Application of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in combination with attenuated total reflection (ATR) for rapid analysis of the tequila production process. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 21(3).

Niimi, J., Liland, K.H., Tomic, O., Jeffery, D.W., Bastian, S.E.P., and Boss, P.K. 2021. Prediction of wine sensory properties using mid-infrared spectra of Cabernet Sauvignon and Chardonnay grape berries and wines. Food Chemistry. 344, 128634.

Nolasco-Cancino, H., Jarquín-Martínez, D., Ruiz Terán, F., and Santiago-Urbina, J. 2022. Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-SCFI-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. Biotecnia. 24(2).

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D.A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., and Xia, J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. Nucleic Acids Research. 49, W388-W396.

Quintero-Arenas, M.A., Meza-Márquez, O.G., Velázquez-Hernández, J.L., Gallardo-Velázquez, T., and Osorio-Revilla, G. 2020. Quantification of adulterants in mezcal by means of FT-MIR and FT-NIR spectroscopy coupled to multivariate analysis. CyTA - Journal of Food. 18(1), 229-239.

Rios-Colín, A.C., Ruiz-Vega, J., Silva-Rivera, M.E., Caballero-Caballero, M., and Montes-Bernabé, J.L. 2022. Evaluación longitudinal de la sustentabilidad del subsistema de producción maguey-mezcal artesanal, en el municipio de Villa Sola de Vega, Oaxaca, México. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 25(1).

Sánchez-Gómez, J., Pardo-Núñez, J., Cuevas-Reyes, V., and Romero- Romero, Y. 2022. Characteristics and socio-productive problems of women mezcal producers in Oaxaca, México. Agro Productividad. 3.

Silva, S.D., Feliciano, R.P., Boas, L.V., and Bronze, M.R. 2014. Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. Food Chemistry. 150, 489-493.

Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A.K., and Westerhuis, J.A. 2012. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. Metabolomics. 8(S1), 3-16.

Tabago, M.K.A.G., Calingacion, M.N., and Garcia, J. 2021. Recent advances in NMR-based metabolomics of alcoholic beverages. Food Chemistry: Molecular Sciences. 2, 100009.

Van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., and van der Werf, M.J. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics. 7, 142.

Vázquez-Pérez, N., Blancas, J., Torres-García, I., García-Mendoza, A., Casas, A., Moreno-Calles, A.I., Maldonado-Almanza, B., and Rendón-Aguilar, B. 2020. Conocimiento y manejo tradicional de *Agave karwinskii* en el sur de México. Botanical Sciences. 98(2), 328-347.

Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., and López, M. 2010. Major and minor compounds in a mexican spirit, young mezcal coming from two agave species, Czech Journal of Food Sciences. 28(2), 127-132.

Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., and Chávez-Servia, J. 2018. Volatile compound profiles in mezcal spirits as influenced by agave species and production processes. Beverages. 4(1), 9.

Westerhuis, J.A., van Velzen, E.J.J., Hoefsloot, H.C.J., and Smilde, A.K. 2008. Discriminant Q2 (DQ2) for improved discrimination in PLSDA models. Metabolomics. 4(4), 293-296.

Windig, W., Shaver, J., and Bro, R. 2008. Loopy MSC: A simple way to improve multiplicative scatter correction. Applied Spectroscopy. 62(10), 1153-1159.

Wu, Z., Xu, E., Long, J., Zhang, Y., Wang, F., Xu, X., Jin, Z., and Jiao, A. 2015. Monitoring of fermentation process parameters of Chinese rice wine using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. Food Control. 50, 405-412.

Yadav, P.K., and Sharma, R.M. 2019. Classification of illicit liquors based on their geographic origin using Attenuated total reflectance (ATR) – Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics. Forensic Science International. 295, e1-e5.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Potential of *Verrucodesmus verrucosus* in the removal of nitrogen and phosphorus structures from pig farms wastewater

Potencial de *Verrucodesmus verrucosus* en la remoción de estructuras de nitrógeno y fósforo de aguas residuales de granjas porcinas

Ana Gabriela Zenteno Carballo[1], Yazmin Sánchez Roque[1]*, Sergio Saldaña Trinidad[1], Miguel Angel Canseco Pérez[1], Roberto Berrones Hernández[1] and Yolanda del Carmen Pérez Luna[1]*

[1] Research laboratory, Universidad Politécnica de Chiapas, Carretera Tuxtla-Villaflores KM. 1+500, Las Brisas, C. P. 29150, Suchiapa, Chiapas, México.

ABSTRACT

Verrucodesmus verrucosus in residual water from a pig farm located in Suchiapa, Chiapas, Mexico, was evaluated as a mixotrophic culture medium. The evaluation was carried out for 40 days, under a 12:12 light / dark cycle; two growth stages were evaluated (piglet and fattening) and the 50:50 mixture of these, as well as to the residual water two pre-treatments were applied, this consisted of a filtration process using a 15 µm diameter nylon filter and a sterilization process. The microalgal species *Verrucodesmus verrucosus* was shown to have bioremediation potential by growing in wastewater and producing biomass, demonstrating high efficiency in removing contaminants. The maximum Chemical Oxygen Demand (COD) removal was in the Ps treatment (sterile piglet) where the removal of 96.8 % was reached, while the Biochemical Oxygen Demand (BOD) had a maximum removal of 96.7 % in the Pf treatment (filtered piglet). The removal of total nitrogen, ammonia and nitrate was demonstrated with a percentage of 85.5 %, 74 % and 91 % respectively. As for the maximum removal of phosphorus and phosphate, they reach values of 97.9 % and 82 % respectively. On the other hand, it was possible to demonstrate the antagonistic capacity of this microalgae with respect to *Escherichia coli,* where 100 % elimination was achieved.

Keywords: biomass; maximum removal; mixotrophic; wastewater

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el potencial de biorremediación de la especie de microalga *Verrucodesmus verrucosus* en aguas residuales de una granja porcina ubicada en Suchiapa, Chiapas, México, como medio de cultivo mixotrófico. La evaluación se realizó durante 40 d, bajo el ciclo 12:12 luz/oscuridad, se evaluaron dos etapas de crecimiento (lechón y engorde) y la mezcla 50:50 de estos, así también al agua residual se le realizaron dos pretratamientos, estos consistieron en un proceso de filtración mediante un filtro de nylon de 15 µm de diámetro y un proceso de esterilización. Se demostró que la especie de microalgas *Verrucodesmus verrucosus* tiene potencial de biorremediación al crecer en aguas residuales y producir biomasa, demostrando una alta eficiencia en la eliminación de contaminantes. La máxima remoción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) fue en el tratamiento Ps (lechón estéril) donde se alcanzó la remoción del 96,8 %, mientras que la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) tuvo una remoción máxima del 96,7 % en el tratamiento Pf (lechón filtrado). Se demostró la remoción de nitrógeno total, amoniaco y nitrato con un porcentaje de 85.5 %, 74 % y 91 % respectivamente. En cuanto a la remoción máxima de fósforo y fosfato, alcanzan valores de 97.9 % y 82 % respectivamente. Por otro lado, se pudo demostrar la capacidad antagónica de esta microalga con respecto a *Escherichia coli*, donde se logró el 100 % de eliminación.

Palabras clave: biomasa; eliminación máxima; mixotrófico; aguas residuales

INTRODUCTION

At present, there is an exponential increase in swine farms around the world to meet the increasing demand for proteins, resulting in a significant amount of swine/piggery wastewater (Nagarajan *et al*., 2019), which has become a serious environmental concern, due to the high levels of nutrients and toxic contaminants that significantly impact on the ecosystem and public health (Cheng *et al*., 2019).

Swine wastewater is categorized as one of the agricultural wastewaters with high contents of organics and nutrients including nitrogen and phosphorus, which may lead to environmental eutrophication. So too in slaughterhouse process, and wastewaters are considered as a hotspot for antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues and may thus play an important role for their dissemination into the environment (Banach *et al*., 2018; Li *et al*., 2018; Savin *et al*., 2020). In this sense, insufficient technologies to remove those nutrients could lead to environmental problems after discharge. Several physical and chemical methods have been applied to treat the swine wastewater, the degradation capacity of these conventional treatment technologies is limited, especially regarding heavy metals, nutrients, and xenobiotics, steering the researchers to bioremediation using microalgae (Phycoremediation). In this sense, bioremediation can be defined as the use of microalgae for removal or biotransformation of pollutants and CO_2 from wastewater with concomitant biomass production. Bioremediation with microalgae is particularly effective because of their capabilities of converting solar energy into useful biomasses and assimilate nutrients such as phosphorus and nitrogen which

*Author for correspondence: Yolanda del Carmen Pérez Luna, Yazmin Sánchez Roque
e-mail: yperez@upchiapas.edu.mx; ysanchez@ia.upchiapas.edu.mx
Received: November 13, 2023
Accepted: April 2, 2024
Published: May 3, 2024

cause eutrophication in the photosynthesis process. In tertiary wastewater treatment, microalgae offer an effective low-cost approach to remove contaminants and excess nutrients, and produce potentially valuable biomass, because of its high ability for inorganic nutrient uptake, showing high ability to remove inorganic nutrients from artificial domestic secondary effluents (Wang *et al*., 2016; Feng *et al*., 2020; Lu *et al*., 2020). Thus, biological treatments are considered as the promising methods due to the cost effectiveness and performance efficiency, along with the production of valuable products and bioenergies (Cheng *et al*., 2020; Chen *et al*., 2020 a,b).

The use of a microalgal biomass is a powerful tool to adequately operate wastewater treatment processes, providing valuable information to model wastewater treatment systems (Sánchez-Zurano *et al*., 2020). So too, several types of microalgae such as *Chlorella* and *Dunaliella* have proved their applicability in wastewaters treatment, reporting average removals of NH_4–N (40 – 51 %), PO_4–P (33 – 43 %) and Chemical Oxygen Demand (38 – 63 %) (Wang *et al*., 2014; Cai *et al*., 2017; Li *et al*., 2018; Chen *et al*., 2020). However, it is important to identify other microalgae with potential for bioremediation, which could achieve higher removal values, since each microalgal morphotype responds differently under specific growth conditions, so also with respect to its tolerance and resistance to the growth medium composition (Pei *et al*., 2018).

Due to the foregoing, the present research work aimed to evaluate the microalgal biomass of *Verrucodesmus verrucosus* in bioremediation of wastewater from pig farms, as well as the removal of *Escherichia coli* as a pathogenic microorganism.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

The samples were taken from the pig farm called "El Chano" in the municipality of Suchiapa, Chiapas, located at 16°37'05"N 93°05'39"W. One liter of residual water was collected, from the piglet and fattening growth stages, accumulated during the day, considering that cleaning is carried out daily. The residual water was stored in previously sterilized plastic bottles, at 4 °C (NMX-AA-034-SCFI-2015).

Treatment establishment

Nine wastewater treatments were established from the collection of two growth stages: piglet (P) and fattening (F), including a combination of these (50/50); the wastewater was evaluated as it was collected (crude), so too, wastewater was filtered (f) using a 15 µm diameter sieve and sterilized (s) in autoclave at 121°C for 15 min, as established in Table 1.

After having identified the treatments, they were characterized by the quantification of ammonium, nitrate, phosphorus, phosphate and nitrogen, to subsequently inoculate *Verrucodesmus verrucosus* and evaluate for 40 days its behavior, through growth kinetics and its subsequent removal capacity as well as its antagonistic capacity against *Escherichia coli*, as described below and shown in Figure 1.

Table 1. Establishment of treatments from porcine wastewater under the bioremediation of *Verrucodesmus verrucosus*.
Tabla 1. Establecimiento de los tratamientos a partir de aguas residuales porcinas bajo biorremediación con *Verrucodesmus verrucosus*.

Treatments	Growth stage	Levels		
		Filtered waste water	Sterile waste water	Crude waste water
Pf	Piglet	X		
Ps	Piglet		X	
Pc	Piglet			X
Ff	Fattening	X		
Fs	Fattening		X	
Fc	Fattening			X
50/50f	50 Piglet /50 Fattening	X		
50/50s	50 Piglet /50 Fattening		X	
50/50c	50 Piglet /50 Fattening			X

Growth stage [P = Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50 % of piglet and 50 % of fattening]. Each treatment was analyzed the mean of three repetitions.

Physical and chemical analyses of water samples

For the characterization of residual water, the total nitrogen (N) was analyzed by Kjeldahl method (Stafilov *et al*., 2020), potential of hydrogen (pH) with the use of a potentiometer (HANNA HI 2211-01) (NMX-AA-008-SCFI-2011), according to Jin *et al.* (2019). Also, ammonium, nitrate, total phosphorous and phosphate were analyzed by quantitative colorimetric analysis according to Pei *et al*. (2018), Zhu *et al.* (2008), Feng *et al.* (2020) and Wilfert *et al.* (2018), respectively. Finally, the determinations of Chemical Oxygen Demand (COD) and Biochemical Oxygen Demand (BOD) were performed according to NMX-AA-030/1-SCFI-2012 and NMX-AA-028-SCFI-2000, respectively.

Microorganism and culture conditions

Verrucodesmus verrucosus was provided by the UAMI Applied Fiction Laboratory (Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa). The cells are elliptical, without appendages and curved edges. *V. verrucosus* can form cenobium obes containing 4, 8, 16, or more cells between 4 and 6 µm in size. The specie was recently described by Hegewald *et al*. (2013) and López-Mendoza *et al*. (2015), with GenBank accession number JQ240289. *Verrucodesmus verrucosus* was evaluated in the nine wastewater treatments in a period of 40 d with an initial inoculation of 25 CFU mL^{-1} at a temperature of 25 °C $\pm$ 2.

Escherichia coli quantification

The quantity of the coliform group microorganisms was determined according to the Mexican Standard NMX-AA-42-1987, and according to the total coliform quantification protocols established by Banach *et al*. (2018).

Productivity and growth kinetics

Growth kinetics were performed by cell count in a Neubauer chamber, and plate count by colony forming units (CFU). The cultures were shaken in each of the flasks to allow a uniform

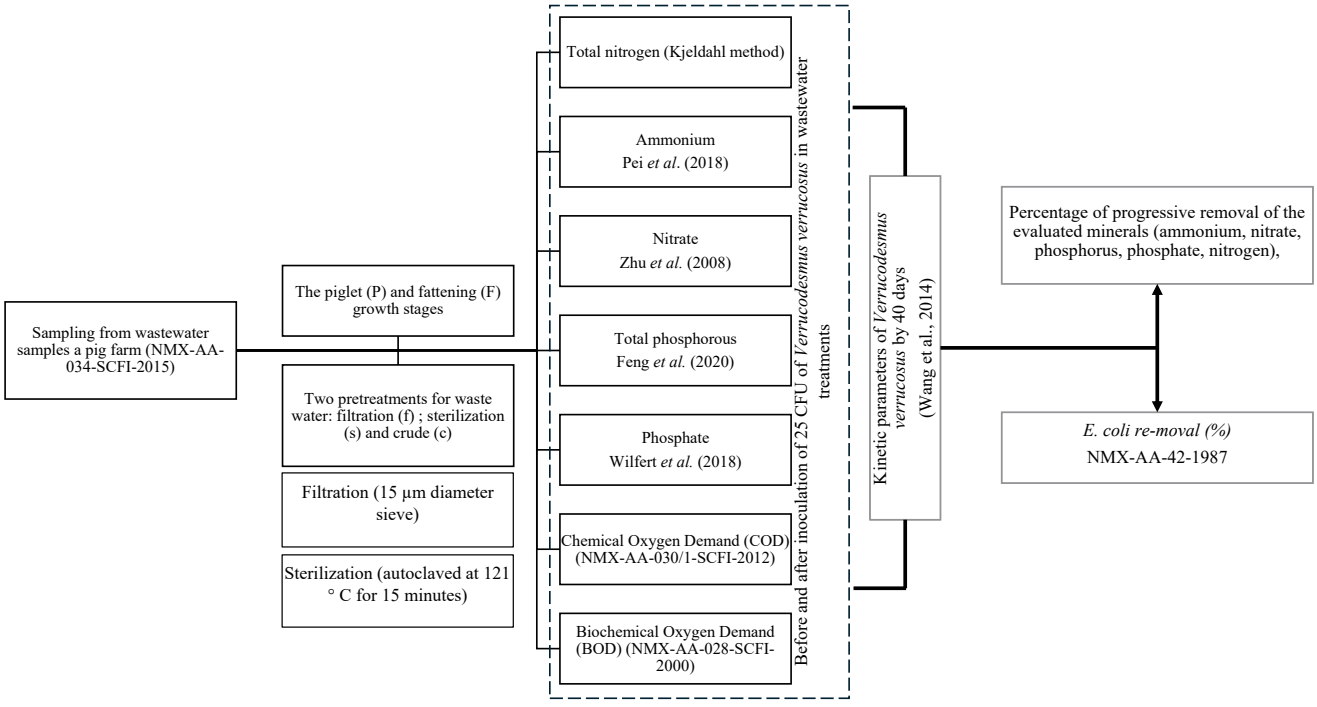


Figure 1. Methodological development for the evaluation of *Verrucodesmus verrucosus* potential in the removal of nitrogen and phosphorus structures from wastewater from pig farms.
Figura 1. Desarrollo metodológico para la evaluación del potencial de *Verrucodesmus verrucosus* en la remoción de estructuras de nitrógeno y fósforo de aguas residuales de granjas porcinas.

distribution of cells, and 1 mL samples were taken and placed in previously washed tubes. The camera was observed in the microscope with 100X objective. The cell concentration (CFU mL^{-1}) was calculated using the following formula, Eq. (1):

$$C = N * 10^4 * dil \quad (1)$$

Where C is the cell concentration (CFU mL^{-1}), N is the average of cells present in $1mm^2$ (0.1µL), dil the dilution factor and 10^4 the conversion factor from 0.1µL to 1mL. From these data the specific growth rate was determined, which was calculated with the following exponential equation (Wang *et al*., 2014), Eq. (2):

$$\mu_e = (\ln N_t - \ln N_0)/(t_2 - t_1) \quad (2)$$

Where, µ is the specific growth rate in days, ln is the natural logarithm, N_0 corresponds to the initial population concentration (CFU mL^{-1}), N_t concentration after the final growth time (CFU mL^{-1}), t_1 initial time for the growth interval of interest in days, and t_2 final time of growth of the interval in days.

Statistical analysis

The parameters of the evaluations were estimated using a sigmoidal model, and Gompertz (Sigma plot ® v.11.0) was used for the correlation evaluation between points. An analysis of variance (ANOVA) was performed in order to evaluate the differences between groups. The means of each treatment were compared using the Tukey method ($p \leq 0.05$). The analyzes were carried out using the statistical software Minitab18®.

RESULTS

Wastewater characterization

The characterization of the residual water from a pig farm was carried out at two stages of growth (piglet and fattening) and the mixture between these (50/50), subjected to two treatments (sterilization and filtering), which is why it is possible to identify the higher concentrations in the fattening crude stage for ammonium, nitrate, phosphorous, phosphate, nitrogen, chemical oxygen demand and biochemical oxygen demand in the values of 1992.38 mg mL^{-1}, 9546.76 mg mL^{-1}, 1410.14 mg mL^{-1}, 2999.58 mg mL^{-1}, 49%, 1629.56 mg mL^{-1} and 896.25 mg mL^{-1}, respectively (Table 2).

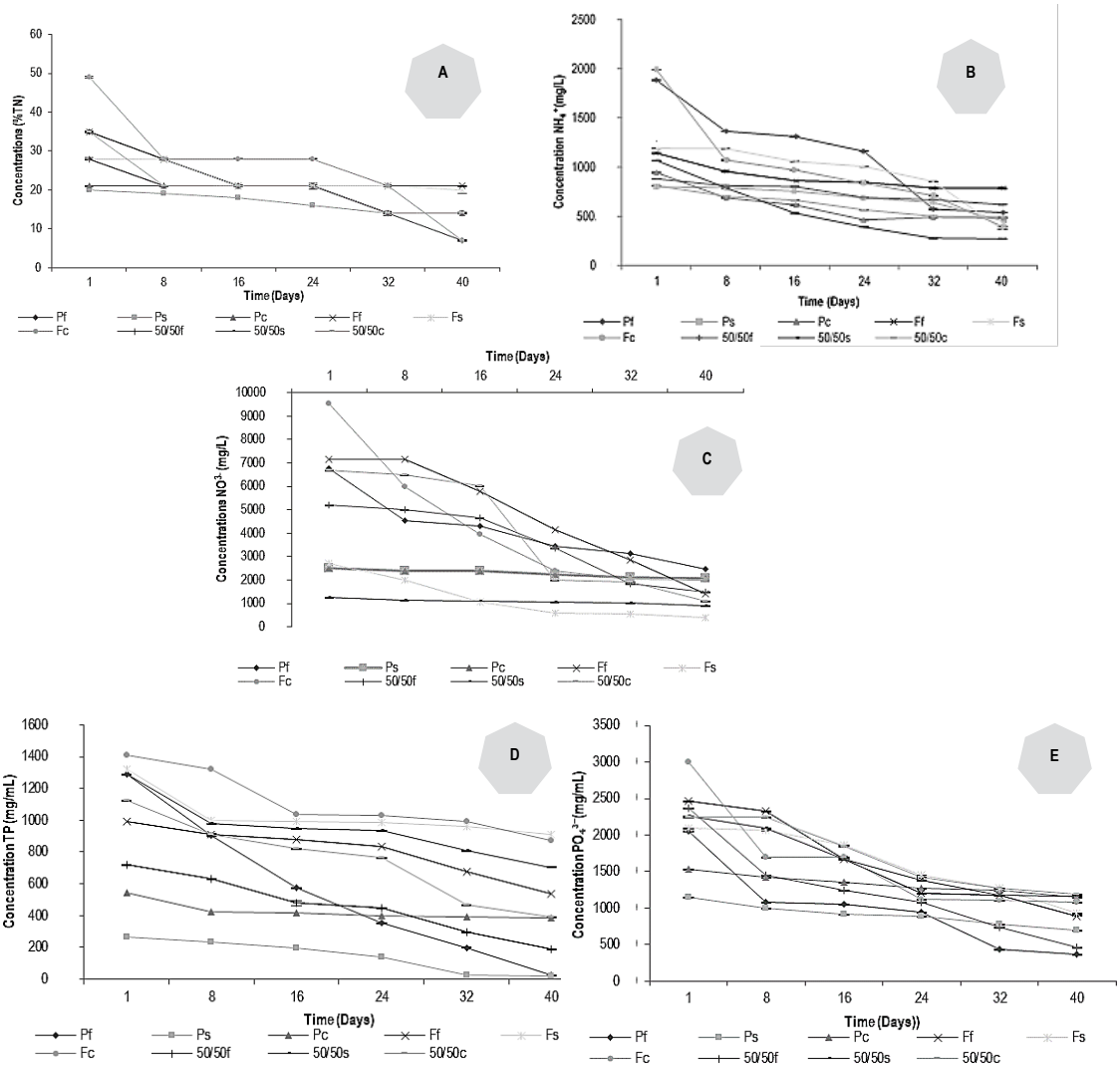
Mineral kinetics

In the kinetics of minerals, the progressive removal of the evaluated minerals is observed (ammonium, nitrate, phosphorous, phosphate, nitrogen), however it is important to mention that *Verrucodesmus verrucosus* demonstrated to start the decrease of minerals in the medium at day eight, reaching levels of highest removal at day 32 of evaluation, so it was determined in this research that the average removal time for these microalgae is 32 to 40 days (Figure 2 a to e).

Table 2. Characterization of wastewater from pig farms taken from two growth stages.
Tabla 2. Caracterización de aguas residuales de granjas porcinas tomadas de dos etapas de crecimiento.

Treatments	Ammonium NH_4^+ (mg L^{-1})	Nitrate NO_3^- (mg L^{-1})	Phosphorus P_4 (mg L^{-1})	Phosphate PO_4^{3-} (mg L^{-1})	Nitrogen N (%)	COD (mg L^{-1})	BOD (mg L^{-1})
Pf	1884.73 ± 0.07^{b*}	6752.24 ± 0.06^{b}	1288.54 ± 0.04^{b}	2057.57 ± 0.00^{d}	35 ± 0.01^{b}	262.68 ± 0.04^{d}	144.47 ± 0.12^{d}
Ps	800.01 ± 0.04^{d}	2504.23 ± 0.01^{d}	263.17 ± 0.00^{e}	1145.95 ± 0.00^{f}	20 ± 0.12^{d}	1335.81 ± 0.14^{b}	734.69 ± 0.00^{b}
Pc	944.61 ± 0.01^{cd}	5509.04 ± 0.04^{c}	545.41 ± 0.00^{d}	1530.99 ±0.08^{e}	21 ± 0.04^{d}	474.56 ± 0.11^{d}	261.00 ± 0.03^{d}
Ff	1141.09 ± 0.00^{c}	7165.07 ± 0.01^{b}	992.79 ± 0.01^{c}	2471.83 ± 0.11^{b}	35 ± 0.11^{b}	1207.68 ± 0.09^{b}	664.22 ± 0.03^{b}
Fs	1191.62 ± 0.00^{c}	2693.26 ± 0.00^{d}	1323.07 ± 0.05^{a}	2091.52 ± 0.12^{d}	28 ± 0.13^{c}	1670.81 ± 0.11^{a}	918.94 ± 0.00^{a}
Fc	1992.38 ± 0.01^{a}	9546.76 ± 0.07^{a}	1410.14 ± 0.10^{a}	2999.58 ± 0.01^{a}	49 ± 0.03^{a}	1629.56 ± 0.09^{a}	896.25 ± 0.14^{a}
50/50f	881.64 ± 0.06^{d}	5202.56 ± 0.03^{c}	719.56 + 0.12^{c}	2369.82 ± 0.04^{bc}	28 ± 0.00^{c}	830.18 ± 0.05^{c}	456.60 ± 0.07^{bc}
50/50s	1068.31 ± 0.05^{c}	1242.38 ± 0.00^{e}	1291.54 ± 0.08^{b}	2253.47 ± 0.06^{c}	28 ± 0.06^{c}	841.43 ± 0.11^{c}	462.79 ± 0.11^{bc}
50/50c	809.66 ± 0.05^{d}	6677.36 ± 0.00^{b}	1126.40 ± 0.00^{b}	2249.25 ± 0.08^{c}	35 ± 0.00^{b}	1645.18 ± 0.00^{a}	904.85 ± 0.05^{a}

* Mean of three repetitions. ** The averages (± standard error) within each column without common superscript differ significantly at P <0.05. Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening]. COD: Chemical Oxygen Demand; BOD: Biochemical Oxygen Demand



Mean of three repetitions. The averages (± standard error). Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening]. A: total nitrogen concentration; B: Ammonium concentration; C: Nitrate concentration; D: Total phosphorus concentration; E: Phosphate concentration

Figure 2. Kinetics of minerals removal by *Verrucodesmus verrucosus* present in the wastewater from pig farms evaluated for 40 days.
Figura 2. Cinética de remoción de minerales por *Verrucodesmus verrucosus* presente en aguas residuales de granjas porcinas evaluadas durante 40 días.

On the other hand, the growth stage with the highest removal was the piglet stage, for the minerals phosphorus and phosphate with 97.98 %, 82.18 % respectively, in the filtered and sterilized treatments. However, the fattening stage has the highest removals in nitrate and nitrogen with 85.65 % and 85.71% respectively, in the sterilized treatments for nitrate. So, it is also important to mention that the decrease in nitrogen is significantly higher compared to the other treatments in its crude form (Table 3 and Figure 2).

At the conclusion of the mineral kinetics, it was determined that *V. verrucosus* has, on average, the ability to remove ammonia, nitrate, phosphorus, phosphates and nitrogen at percentages of 54.13 %, 77.51 %, 57.73 %, 54.22 % and 53.06 % respectively, so that this microalgae has an average mineral removal capacity in pork wastewater of 66.24 %, benefiting the removal processes by applying sterilization and filtration treatments (Table 3).

COD and BOD removal kinetics

During the kinetics evaluation of the chemical and biochemical oxygen demand, a significant removal is observed at 32 days after *V. verrucosus* inoculation, thus also identifying that residual water from the lechon growth stage reaches higher removal rates of 92 and 96 % for BOD and COD, respectively (Figure 3 and Table 3).

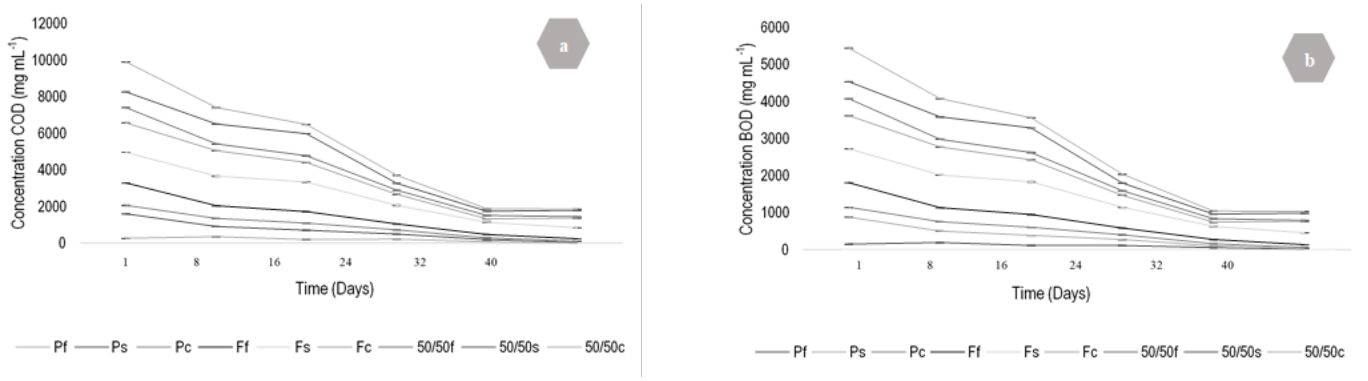
***Escherichia coli* removal**

During the growth kinetics of *V. verrucosus* the start of the exponential stage is observed at 8 days, demonstrating the maximum growth rate of 0.14 CFU / Day in the sterile fattening treatment and the shortest doubling time of 4.31 d, therefore the removal values begin to be important, however the exponential stage ends between 24 and 32 d, data that correlates the higher removal values for the minerals as well as the chemical and biochemical oxygen demands. On the

Table 3. Removal percentage of *Verrucodesmus verrucosus* evaluated in pig wastewater for 40 day.
Table 3. Porcentaje de eliminación de *Verrucodesmus verrucosus* evaluado en aguas residuales porcinas durante 40 días.

	Removal percentage (%)						
Treatments	**Ammonium (NH_4^+)**	**Nitrate (NO_3^-)**	**Phosphorus (P_4)**	**Phosphate (PO_4^{3-})**	**Nitrogen (N)**	**COD**	**BOD**
Pf	$71.47 \pm 0.02^{a*}$	63.46 ± 0.08^{e}	97.98 ± 0.10^{a}	82.18 ± 0.00^{a}	80 ± 0.01^{b}	92.55 ± 0.14^{a}	96.75 ± 0.12^{a}
Ps	58.68 ± 0.09^{b}	61.28 ± 0.04^{e}	93.55 ± 0.02^{a}	39.66 ± 0.10^{e}	50 ± 0.16^{d}	96.75 ± 0.11^{a}	93.63 ± 0.18^{a}
Pc	48.89 ± 0.07^{c}	69.61 ± 0.01^{d}	28.90 ± 0.00^{f}	24.79 ± 0.16^{f}	33.33 ± 0.08^{f}	93.63 ± 0.19^{a}	92.55 ± 0.05^{a}
Ff	31.15 ± 0.00^{d}	80.07 ± 0.11^{c}	45.97 ± 0.13^{d}	63.80 ± 0.02^{b}	40 ± 0.16^{e}	86.99 ± 0.03^{b}	86.99 ± 0.12^{b}
Fs	69.24 ± 0.00^{a}	85.65 ± 0.11^{b}	31.20 ± 0.07^{d}	55.46 ± 0.00^{c}	28.57 ± 0.01^{g}	65.08 ± 0.17^{c}	65.08 ± 0.10^{c}
Fc	63.91 ± 0.10^{ab}	82.57 ± 0.12^{c}	38.00 ± 0.00^{e}	46.28 ± 0.12^{d}	85.71 ± 0.02^{a}	66.27 ± 0.10^{c}	66.27 ± 0.17^{c}
50/50f	29.84 ± 0.16^{e}	71.65 ± 0.00^{d}	73.44 ± 0.01^{b}	80.51 ± 0.15^{a}	50 ± 0.12^{d}	93.87 ± 0.02^{a}	93.87 ± 0.10^{a}
50/50s	74.60 ± 0.00^{a}	91.92 ± 0.13^{a}	45.44 ± 0.13^{d}	48.26 ± 0.02^{d}	50 ± 0.17^{d}	58.67 ± 0.16^{d}	58.67 ± 0.19^{d}
50/50c	39.45 ± 0.05^{d}	91.44 ± 0.05^{a}	65.17 ± 0.13^{c}	47.09 ± 0.16^{d}	60 ± 0.11^{c}	95.16 ± 0.01^{a}	95.16 ± 0.02^{a}
Mean**	$54.13 \pm 0.05^{c**}$	$77.51 \pm 0.07^{b**}$	$57.73 \pm 0.06^{c**}$	$54.22 \pm 0.08^{c**}$	$53.06 \pm 0.10^{c**}$	$83.24 \pm 0.13^{a**}$	$83.21 \pm 0.11^{a**}$
Total mean	66.24 ± 0.08						

*Mean of three repetitions. ** The averages (± standard error) within each column without common superscript differ significantly at P <0.05. Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening]. COD: Chemical Oxygen Demand; BOD: Biochemical Oxygen Demand



Mean of three repetitions. The averages (± standard error). Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening]. a: Chemical Oxygen Demand concentration; b: Biochemical Oxygen Demand concentration

Figure 3. Kinetics of removal of Chemical and Biochemical Oxygen Demand (COD, BOD) by ***Verrucodesmus verrucosus*** evaluated in pig waste water for 40 days.
Figura 3. Cinética de remoción de la Demanda Química y Bioquímica de oxígeno (DQO, DBO) por ***Verrucodesmus verrucosus*** evaluado en aguas residuales de granjas porcinas por 40 días.

other hand, it is observed how kinetics of *Escherichia coli* decreases significantly after 8 days of inoculating *V. verrucosus,* decreasing the bacterial population in its entirety at 32 d. Therefore, *V. verrucosus* demonstrated 100 % removal of the *E.coli* bacterial population within 24 d (Figure 4 and Table 4).

DISCUSSION

Wastewater characterization

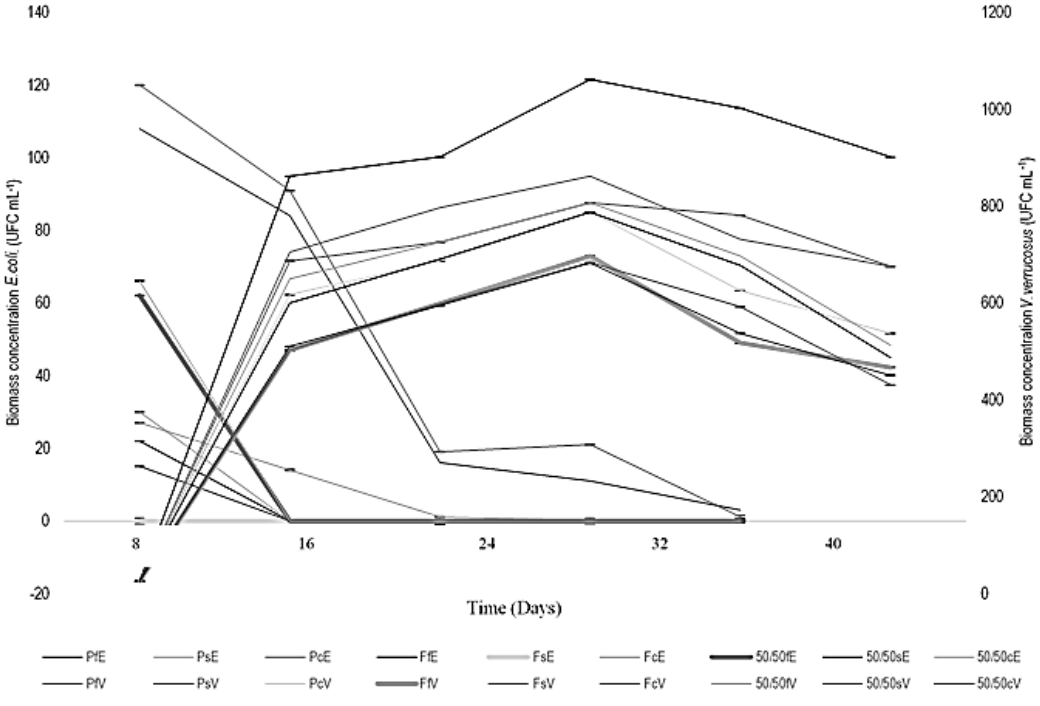
Swine wastewater is rich in nitrogen and organic carbon, however, in the present research it was shown that the wastewater from fattening pigs, corresponding to an adult age, showed the highest concentrations in the different nitrogen

Table 4. Kinetic parameters and antagonistic potential of the *Verrucodesmus verrucosus* microalgae biomass evaluated in pig wastewater for 40 days.

Tabla 4. Parámetros cinéticos y potencial antagónico de la biomasa microalgal de *Verrucodesmus verrucosus* evaluada en aguas residuales porcinas durante 40 días.

Treatment	Initial biomass (CFU mL^{-1})		Final biomass (CFU mL^{-1})		μ (CFU Day^{-1})	Td (Day)	*E. coli* removal (%)
	V. verrucosus	*E. coli*	*V. verrucosus*	*E.coli*			
Pf	25 ± 0.16^{a}	108 ± 0.22^{b}	781 ± 0.21^{b}	3 ± 0.09^{a}	0.14 ± 0.06^{d}	4.63 ± 0.05^{d}	97.22 ± 0.01^{a}
Ps	25 ± 0.01^{a}	27 ± 0.15^{d}	1002 ± 0.18^{a}	0 ± 0.01^{c}	0.16 ± 0.03^{a}	4.31 ± 0.01^{e}	100 ± 0.018^{a}
Pc	25 ± 0.09^{a}	120 ± 0.18^{a}	625 ± 0.11^{d}	1 ± 0.21^{b}	0.13 ± 0.01^{f}	4.95 ± 0.09^{b}	99.16 ± 0.07^{a}
Ff	25 ± 0.02^{a}	22 ± 0.27^{d}	517 ± 0.07^{f}	0 ± 0.02^{c}	0.13 ± 0.10^{e}	5.26 ± 0.12^{a}	100 ± 0.03^{a}
Fs	25 ± 0.12^{a}	0 ± 0.01^{f}	592 ± 0.0^{e}	0 ± 0.00^{c}	0.13 ± 0.11^{e}	5.03 ± 0.08^{b}	100 ± 0.09^{a}
Fc	25 ± 0.2^{a}	30 ± 0.11^{d}	537 ± 0.12^{e}	0 ± 0.00^{c}	0.13 ± 0.03^{f}	5.19 ± 0.01^{a}	100 ± 0.05^{a}
50/50f	25 ± 0.18^{a}	62 ± 0.31^{c}	697 ± 0.09^{c}	0 ± 0.00^{c}	0.14 ± 0.11^{b}	4.79 ± 0.12^{c}	100 ± 0.12^{a}
50/50s	25 ± 0.11^{a}	15 ± 0.17^{e}	731 ± 0.12^{b}	0 ± 0.00^{c}	0.14 ± 0.12^{b}	4.72 ± 0.01^{c}	100 ± 0.12^{a}
50/50c	25 ± 0.12^{a}	66 ± 0.14^{c}	677 ± 0.06^{c}	0 ± 0.10^{c}	0.14 ± 0.09^{c}	4.83 ± 0.19^{b}	100 ± 0.12^{a}

* Mean of three repetitions. ** The averages (± standard error) within each column without common superscript differ significantly at P <0.05. Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening].



Mean of three repetitions. The averages (± standard error). Growth stage [P=Piglet; F= Fattening] Treatments [s = Sterile; c = Crude; f = Filtered] Mix [50/50 = 50% of piglet and 50% of fattening].

Figure 4. Growth kinetics and antagonistic potential of *Verrucodesmus verrucosus* microalgal biomass evaluated in pig wastewater for 40 days.

Figura 4. Cinética de crecimiento y potencial antagónico de la biomasa microalgal de *Verrucodesmus verrucosus* evaluada en aguas residuales de granjas porcinas por 40 días.

and phosphorus forms evaluated (Table 2), *data similar to that reported by Wen et al.* (2017), they evaluated the resistance condition of *Chlorella vulgaris* in undiluted swine slurry and artificial wastewater, identifying concentrations higher than 2000 mg / L of the different forms of TN and TP.

This is because fattening pigs consume a more complete diet accompanied by chemical compounds that modulate feed conversion, associated with digestibility coefficient problems, such as bad absorption or bacterial infections that force the use of antibiotics, generating feces loaded with organic and inorganic matter that convert wastewater into a complex mixture. It is also important to mention that the nitrogen and phosphorous retention capacity decreases with the age of the animal (Wang *et al*., 2017; Likiliki *et al*., 2020).

Mineral kinetics

During the mineral removal kinetics, it was determined that *V. verrucosus* has the ability to decrease the concentration of phosphorus and phosphate present in wastewater of piglets, from 82 to 97.98 % of removal respectively. Thus, removal concentrations of 85.71% were demonstrated for nitrogen evaluated in this research work, it is also important to mention that the highest total nitrogen removals are found in crude treatments (Table 3). Similar data has been reported by Garcia *et al*. (2018), who mentioned that results revealed a high diversity and rapid variations in the structure of microalgae populations, *Chlorella sp*., were recorded in the removal efficiencies (REs) of total organic carbon (86 – 87 %), inorganic carbon (62 – 71 %), total nitrogen (82 – 85 %) and total phosphorous (90 – 92 %).

According to the aforementioned, Sudiarto *et al*. (2019) studied the removal of nitrogen and phosphorus from the effluent of treated swine wastewater by *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Limnobium laevigatum*, and *Lemna sp*. *Pistia stratiotes* showed the highest total nitrogen removal (63.15 %) from the treated effluent, *Lemna sp.* showed the highest phosphorus removal of 36.15 % from the treated effluent. Caí *et al.* (2019) also showed that *Spirulina platensis* removal efficiency of ammonium was 99 %, which provides an alternative method for the utilization of Digested Piggery Wastewater (DPW).

However, Chen *et al.* (2020) evaluated *Desmodesmus sp*., a microalgae belonging to the same family of *V. verrucosus*, showing that *Desmodesmus sp.* PW1grew well in diluted and undiluted piggery wastewater, and could effectively remove nitrogen and phosphorus with removal rates up to 90 % and 70 %, respectively. At laboratory scale by 30L photobioreactor, microalgae also performed well in TN (65.3 %) and TP (83.5 %) removal.

It is important to mention that the treatment of fattening without sterilization showed the highest removal values (Table 3), so it is not necessary to implement a treatment to improve the removal capacity of *V. verrucosos*, data that agrees with the work carried out by Wang *et al*. (2016) who evaluated an UV irradiation-based method to treat the piggery wastewater before inoculating the microalgae biomass, in order to reduce microbial competition and benefit the degradation of compounds. However, the microalgae grew well in slurry without treating and achieved outstanding removal efficiencies in total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP), with 89.5 % and 85.3 %, respectively (Rasoul-Amini *et al*., 2014).

The assimilation of nutrients is variable and depends on the level of daily consumption or intake, which are affected by factors such as genetics and mainly age or growth phase.

It has been verified that in piglets from fetal life, the gastrointestinal tract is in charge of supplying in its entirety of metabolites and protective substances through nutrients absorption, the endocytosis of immunoglobulins from colostrum and milk, an activity that guarantees the high absorption and retention of nutritional substances. Another reason is associated with the lumen surface of the small intestine, which is made up of numerous villi at the base where are tubular glands (*Lieberkühn crypts*) that descend to the muscularis mucosa benefiting their high absorption, unlike fattening pigs that with advancing age, a certain percentage of intestinal mucosa velocities atrophy, reducing the efficiency of nutrient absorption, associated with competition for the substrate and problems caused by the presence of *Enterobacteriaceae* (Bibbal *et al*., 2018).

With all of the above, it was possible to demonstrate the potential of *V. verrucosus* to remove minerals in mixotrophic conditions, since the swine wastewater is rich in nitrogen and organic carbon which are essential macronutrients for microalgal growth (Chen *et al*., 2020; Sánchez *et al*., 2020).

The ability of microalgae to feed on minerals present in pigs' wastewater has benefited the accumulation of compounds of biotechnological interest, as mentioned by Li *et al.* (2018), who demonstrated that *Coelastrella sp.* could remove nutrients from anaerobically digested swine wastewater (ADSW) effectively, if its responses to the stress of Cu (II) were less. However, they showed that finding high copper concentrations in the medium increases the concentration of the superoxide dismutase enzyme responsible for pigment synthesis and oxidative stability of lipids synthesized by the microalgae.

COD and BOD removal kinetics

In this research an 83 % average removal of chemical and biochemical oxygen demand by *V. verrucosus* was demonstrated (Table 3). These data agree with those obtained by Chen *et al.* (2020), who evaluated the remove capacity from *Chlorella sorokiniana* in swine wastewater, and demonstrated the COD, TN and TP removal efficiency for the swine wastewater was 90.1, 97.0 and 92.8 %, respectively (Zhou *et al*., 2018).

These results tend to be promising when considering the *V. verrucosus* microalgal biomass, as a potential alternative to remove, since removal efficiencies of 50 % have been demonstrated by facultative aerobic bacteria, which are not very effective with respect to microalgae. As demonstrated by Chen *et al.* (2020), who evaluated the COD removal efficiency (55.46 %) in anaerobic digestion treatment of real piggery wastewater: Treatment efficiency and bacterial diversity.

***Escherichia coli* removal**

Through the evaluation of the microalgal biomass growth kinetics, it was observed that the exponential stage of *V. verrocosus* is coupled to the stationary and death stage of the growth kinetics of *Escherichia coli* (Figure 4). Said aforementioned behavior was observed in other investigations, as mentioned by Wen *et al.* (2017), they identified the stress tolerance of *Chlorella vulgaris* in wastewater, which was verified in artificial wastewater containing different levels of chemical oxygen demand (COD), corresponding to a high bacterial load.

The microalgae *V. verrucosus* demonstrated antagonistic capacity by removing 100 % of *E. coli* (Figure 4 and Table 4), an enterobacterium present at a high concentration in feces deposited in wastewater, as shown in the present work, since slaughterhouse process and wastewater are considered as a hotspot for antibiotic resistant bacteria and antimicrobial residues, which may thus play an important role for their dissemination into the environment (Savin *et al*., 2020).

This phenomenon has been observed previously, for instance, Li *et al.* (2020) identified the effect of antibiotic residue pollution from swine feedlots to nearby groundwater environment, analyzing the presence of residues from most commonly used antibiotics, including tetracyclines (TCs), fluoroquinolones (FQNs), sulfonamides (SAs), macrolides, and fenicols, therefore, antibiotics discharged from swine feedlots through wastewater could disseminate into surrounding groundwater environments, generating antibiotic resistance genes (AGRs) in different microorganisms.

Also, Yang *et al.* (2020) demonstrated that in the wastewater of pig farms was a higher abundance of Proteobacteria, including the potential human pathogenic bacteria (HPB) (*Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella* and *Morganella*), crop pathogen (Pectobacterium) and denitrifying bacteria (Zobellella); the results showed that the bacteria played an important role in the denitrification, which can provide a new point of penetration for improving the bioremove at pig farms, because eradicating the nitrogen present in the wastewater would eliminate a large population of pathogenic bacteria. For this reason, since *V. verrucosus* is efficient in removing nitrogen forms and is also metabolically more active, it is a disadvantage for pathogenic bacteria that try to compete for the substrate (Wu *et al.*, 2020).

Thus, it is also important to mention that the highest biomass production was reached in wastewater from the fattening stage, identifying a direct relationship between biomass and the concentration of pollutants (Table 4, Figure 4). This effect was identified in an evaluation on *C. pyrenoidosa,* where, the results showed the maximum nutrient removal efficiencies at 50 % in the fattening pig wastewater, since the fattening pig wastewater is rich in nutrients, which can be utilized for algal biomass production (Azam *et al*., 2020).

Finally, it is important to mention that according to the aforementioned results, the residual water from pig farms previously treated with *V. verrucosus* can be used for the irrigation of fruit and vegetable crops.

CONCLUSIONS

The use of *V. verrucosus* is a powerful tool to adequately manage and operate wastewater treatment processes, providing valuable information to model wastewater treatment systems with these microalgae, on the other hand, it was shown that this microalgae species grows well in swine wastewater with large amounts of biomass being produced, despite the impact of various parameters (e.g., nutrients and toxicants levels, cultivation conditions, and bacteria in swine wastewater).

It is important to mention that the harvested microalgae biomass elicits high potential for conversion to bioenergy, because the lipids can be used for biodiesel production, and according to this, the development of renewable and clean energy as well as bio-based fine chemicals technologies are the keys to overcome the problems such as fossil depletion, global warming, and environment pollution.

The strategy is therefore a promising method for microalgae to purify piggery slurry containing high nutrient contents, reducing the environmental impact of contaminated waters that damage soils and consumers of food irrigated with these waters.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Universidad Politécnica de Chiapas.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

REFERENCES

Azam, R., Kothari, R., Singh, H. M., Ahmad, S., Ashokkumar, V., and Tyagi, V. V. 2020. Production of algal biomass for its biochemical profile using slaughterhouse wastewater for treatment under axenic conditions. *Bioresource Technology*, 306, 123116. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123116

Bibbal, D., Um, M. M., Diallo, A. A., Kérourédan, M., Dupouy, V., Toutain, P. L., ... and Brugère, H. 2018. Mixing of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant receiving city and slaughterhouse wastewater. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(2), 355-363. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.12.009

Banach, J. L., van Overbeek, L. S., Groot, M. N., Van der Zouwen, P. S., and Van der Fels-Klerx, H. J. 2018. Efficacy of chlorine dioxide on *Escherichia coli* inactivation during pilot-scale fresh-cut lettuce processing. *International Journal of Food Microbiology*, 269, 128-136. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.013

Cai, X. B., Yu, Q. Q., Liu, R., Zhao, Y., and Chen, L. J. 2017. Cultivation of *Spirulina platensis* in digested piggery wastewater pretreated by SBR with *Operating Conditions Optimization*. Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue, 38(7), 2910-2916. doi: https://doi.org/10.13227/j.hjkx.201612168

Chen, C. Y., Kuo, E. W., Nagarajan, D., Ho, S. H., Dong, C. D., Lee, D. J., and Chang, J. S. 2020. Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater

treatment and algal biomass production. *Bioresource technology*, 302, 122814. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122814

Chen, J., Yang, Y., Liu, Y., Tang, M., Wang, R., Hu, H., ... and Zhang, X. 2020. Effects caused by chlortetracycline and oxytetracycline in anaerobic digestion treatment of real piggery wastewater: treatment efficiency and bacterial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(15), 9222-9230. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.138

Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., and Kumar, S. M. 2019. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource technology*, 275, 109-122. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.019

Cheng, H. H., Narindri, B., Chu, H., and Whang, L. M. 2020. Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. *Bioresource technology*, 303, 122861. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122861

Chen, Z., Shao, S., He, Y., Luo, Q., Zheng, M., Zheng, M., ... and Wang, M. 2020. Nutrients removal from piggery wastewater coupled to lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Desmodesmus* sp. PW1. *Bioresource technology*, 302, 122806. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122806

Feng, C., Welles, L., Zhang, X., Pronk, M., de Graaff, D., and van Loosdrecht, M. 2020. Stress-induced assays for polyphosphate quantification by uncoupling acetic acid uptake and anaerobic phosphorus release. *Water research*, 169, 115228. doi: https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115228

García, D., Posadas, E., Blanco, S., Acién, G., García-Encina, P., Bolado, S., and Muñoz, R. 2018. Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresource Technology*, 248, 120-126. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079

Hegewald, E., Bock, C., and Krienitz, L. 2013. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). Fottea, 13(2), 149-164.

Jin, Y., Lin, Y., Wang, P., Jin, R., Gao, M., Wang, Q., ... and Ma, H. 2019. Volatile fatty acids production from saccharification residue from food waste ethanol fermentation: effect of pH and microbial community. *Bioresource technology*, 292, 121957. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121957

Li, X., Yang, W. L., He, H., Wu, S., Zhou, Q., Yang, C., ... and Lou, W. 2018. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource technology*, 251, 274-279. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.058

López-Mendoza, Z., Tavera, R., and Novelo, E. 2015. El fitoplancton de un canal de Xochimilco y la importancia de estudiar ecosistemas acuáticos urbanos. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 18(1): 13-28.

Lu, W., Alam, M. A., Liu, S., Xu, J., and Saldivar, R. P. 2020. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO_2 from livestock farms: A review. Science of the Total Environment, 716, 135247. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247

Li, X., Liu, C., Chen, Y., Huang, H., and Ren, T. 2018. Antibiotic residues in liquid manure from swine feedlot and their effects on nearby groundwater in regions of North China. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 11565-11575. doi: https://doi.org/10.1007/s11356-018-1339-1

Likiliki, C., Convers, B., and Béline, F. 2020. Dataset on the characteristics of the liquid effluent issued from separation of faeces and urine under slats using V-shaped scraper in swine buildings. *Data in Brief*, 30, 105533. doi: https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105533

Nagarajan, D., Kusmayadi, A., Yen, H. W., Dong, C. D., Lee, D. J., and Chang, J. S. 2019. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. *Bioresource technology*, 289, 121718. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121718

NMX-AA-034-SCFI-2015. Water analysis – measurement of salts and solids dissolved in natural water, wastewaters and treated wastewaters - Test method.

NMX-AA-008-SCFI-2011. Water Analysis - pH Determination - Test Method - (Cancels NMX-AA-008- SCFI-2000).

NMX-AA-030/1-SCFI-2012. Water analysis - Determination of the chemical oxygen demand, in natural waters, wastewaters and treated wastewaters - test method - part 1 – Opened reflux method.

NMX-AA-028-SCFI-2000. Water analysis - Determination of the biochemical oxygen demand in natural, wastewaters (bod5) and wastewaters treated - Test method.

NMX-AA-42-1987. Water quality determination of the most likely number (MPN) of total coliforms, fecal coliforms (thermotolerants) and presumptive *Escherichia coli*.

Pei, H., Yang, Z., Nie, C., Hou, Q., Zhang, L., Wang, Y., and Zhang, S. 2018. Using a tubular photosynthetic microbial fuel cell to treat anaerobically digested effluent from kitchen waste: Mechanisms of organics and ammonium removal. *Bioresource technology*, 256, 11-16. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.144

Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Shaker, S., Safari, A., Kazemi, A., Mousavi, P., ... and Ghasemi, Y. 2014. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 126-131. doi: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.003

Sánchez-Roque, Y., Luna, Y. P., Acosta, J. M., Vázquez, N. F., Sebastian, J. P., and Hernández, R. B. 2020. Optimization for the production of *Verrucodesmus verrucosus* biomass through crops in autotrophic and mixotrophic conditions with potential for the production of biodiesel. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 133-147. doi: https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio463

Sánchez-Zurano, A., Gomez-Serrano, C., Acién-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., and Molina-Grima, E. 2020. A novel photo-respirometry method to characterize consortia in microalgae-related wastewater treatment processes. *Algal Research*, 47, 101858. doi: https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101858

Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., ... and Kreyenschmidt, J. 2020. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 727, 138788. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788

Stafilov, T., Špirić, Z., Glad, M., Barandovski, L., Bačeva Andonovska, K., Šajn, R., and Antonić, O. 2020. Study of nitrogen pollution in the Republic of North Macedonia by moss biomonitoring and Kjeldahl method. *Journal of Environmental Science and Health*, Part A, 55(6), 759-764. doi: https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1738825

Sudiarto, S. I. A., Renggaman, A., and Choi, H. L. 2019. Floating aquatic plants for total nitrogen and phosphorus removal from treated swine wastewater and their biomass characteristics. *Journal of environmental management*, 231, 763-769. doi: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.070

Wang, M., Yang, Y., Chen, Z., Chen, Y., Wen, Y., and Chen, B. 2016. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. *Bioresource Technology*, 222, 130-138. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.128

Wang, M., Kuo-Dahab, W. C., Dolan, S., and Park, C. 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresource technology*, 154, 131-137. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.047

Jin, W. A. N. G., Ye, H. A. N., ZHAO, J. Z., ZHOU, Z. J., and Huan, F. A. N. 2017. Consuming fermented distillers' dried grains with solubles (DDGS) feed reveals a shift in the faecal microbiota of growing and fattening pigs using 454 pyrosequencing. *Journal of integrative agriculture*, 16(4), 900-910. doi: https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61523-X

Wilfert, P., Dugulan, A. I., Goubitz, K., Korving, L., Witkamp, G. J., and Van Loosdrecht, M. C. M. 2018. Vivianite as the main phosphate mineral in digested sewage sludge and its role for phosphate recovery. *Water research*, 144, 312-321. doi: https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.020

Wen, Y., He, Y., Ji, X., Li, S., Chen, L., Zhou, Y., ... and Chen, B. 2017. Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. *Bioresource technology*, 243, 247-253. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.094

Wu, W., Cheng, L. C., and Chang, J. S. 2020. Environmental life cycle comparisons of pig farming integrated with anaerobic digestion and algae-based wastewater treatment. *Journal of environmental management*, 264, 110512. doi: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110512

Yang, Y., Xing, S., Li, S., Niu, Y., Li, C., Huang, T., and Liao, X. 2020. Potential regulation of small RNAs on bacterial function activities in pig farm wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Sciences*, 91, 292-300. doi: https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.02.014

Zhou, W., Wang, Z., Xu, J., and Ma, L. 2018. Cultivation of microalgae *Chlorella zofingiensis* on municipal wastewater and biogas slurry towards bioenergy. *Journal of bioscience and bioengineering*, 126(5), 644-648. doi: https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.006

Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., and Wang, S. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. Reviews of environmental contamination and toxicology, 159-195. doi:https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_5

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Extractos vegetales en el crecimiento y concentración nutrimental de hojas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Effect of plant extracts in growth and nutrimental concentration of lettuce leaves (*Lactuca sativa*)

D. E. Moreno-Guerrero[1], S. M. Ramírez-Olvera[2*], H. L. Ojeda-Salgado[3], C. A. Pérez-Mercado[3], Libia Iris Trejo-Téllez[2]

[1] Posgrado de Agroecosistemas Tropicales, Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Veracruz, México.
[2] Posgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.
[3] Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

RESUMEN

El uso de extractos vegetales como bioestimulantes, es una alternativa en la producción agrícola. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aspersión foliar de extractos acuosos de nopal (*Opuntia ficus-indica*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), en el crecimiento y concentración nutrimental de hojas de lechuga. Plántulas de 30 d de edad, se asperjaron con los tratamientos durante 28 d, en intervalos de siete días. La aspersión de los extractos no modificó la altura de planta, ni el número de hojas. El extracto de nopal incrementó la concentración de P, Fe y Zn; mientras que el extracto de cilantro, aumentó la concentración de N, P, Mg, Fe, Cu, Mn, B y Zn. Los extractos vegetales evaluados no tienen influencia en el crecimiento, pero sí en la concentración de nutrimentos en hojas de lechuga.

Palabras clave: Aspersión foliar; cultivar Parris; macro y micronutrimentos.

ABSTRACT

The use of plant extracts as biostimulants is an alternative in agricultural production. The objective of this research was to evaluate the effect of foliar spraying of aqueous extracts of nopal (*Opuntia ficus-indica*) and coriander (*Coriandrum sativum*) on the growth and nutrient concentration of lettuce leaves. Thirty-day-old seedlings were sprayed with the treatments for 28 d, at seven-day intervals. Spraying of the extracts did not modify plant height or leaf number. The nopal extract increased the concentration of P, Fe and Zn; while the coriander extract increased the concentration of N, P, Mg, Fe, Cu, Mn, B and Zn. The evaluated plant extracts had no influence on growth, but did have an influence on the concentration of nutrients in lettuce leaves.

Keywords: Foliar spray; cultivar Parris; macro and micronutrients.

INTRODUCCIÓN

Los bioestimulantes derivados de plantas, incluyen extractos de hojas, raíces o semillas, que en combinación o individualmente tienen un efecto positivo en el metabolismo vegetal (Zulfiqar *et al*., 2020). Mejoran el crecimiento, la absorción, y eficiencia en el uso de nutrimentos esenciales, la actividad de enzimas antioxidantes, y la tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico (Ashraf *et al*., 2016; Posmyk, 2016).

Plantas de moringa (*Moringa oleifera*), ajo (*Allium sativum*) y barbasco guineano (*Tephrosia vogelii*), han mostrado efectos positivos en el crecimiento vegetal (Ali *et al*., 2019; Mkindi *et al*., 2020; Zulfiqar *et al*., 2020). El extracto de hojas de moringa, mejora el crecimiento en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*) (Prabhu *et al*., 2010); tomate (*Solanum lycopersicum*) (Culver *et al*., 2012); yuca (*Manihot esculenta*) (Ndubuaku *et al*., 2015); rábano (*Raphanus sativus*) (Ashraf *et al*., 2016); mandarina (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) (Nasir *et al*., 2016), y geranio (*Pelargonium graveolens*) (Ali *et al*., 2018). Incrementa la concentración de clorofilas, carotenoides, compuestos fenólicos y ácido ascórbico (Ashraf *et al*., 2016; Ali *et al*., 2018). La concentración de N, P, K, Ca, Mn y Zn en hojas (Nasir *et al*., 2016); el rendimiento y la vida poscosecha (Culver *et al*., 2012).

La aplicación del extracto acuoso de ajo, mejora el crecimiento de árboles de pera (*Pyrus communis x P. serotina*) (Abd El–Hamied y El-Amary, 2015), pepino (*Cucumis sativus*) (Xiao *et al*., 2013), y berenjena (*Solanum melongena*) (Ali *et al*., 2019). Incrementa la concentración de N, P, K, Ca y Mn en hojas (Xiao *et al*., 2013), y mejora actividad de enzimas antioxidantes (Ali *et al*., 2019).

La aspersión foliar del extracto acuoso de barbasco guineano a plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), aumenta el número de vainas por planta, el rendimiento de semillas, la concentración de clorofilas, flavonoides y antocianinas (Mkindi *et al*., 2020).

El efecto de los bioestimulantes derivados de plantas, se debe principalmente a los compuestos bioactivos presentes en estos, como fitohormonas, aminoácidos y nutrimentos (Elzaawely *et al*., 2018; Nguyen *et al*., 2020; Hassanein *et al*., 2021). Por lo que el uso de extractos vegetales, es una alternativa sostenible en la mejora de la producción vegetal, y la reducción en el uso productos de síntesis química (Mutale-Joan *et al*., 2020). Sin embargo, son pocos los estudios de los efectos bioestimulantes de otras especies vegetales, cuyos compuestos bioactivos podrían tener efectos positivos en el metabolismo vegetal.

Los cladiodios de nopal (*Opuntia ficus-indica*) y hojas de cilantro (*Coriandrum sativum*) contienen N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, B y Zn (Mohammadipour y Souri, 2019; Hernández-Becerra *et al*., 2022). Además, los cladodios de nopal son fuente de compuestos fenólicos, flavonoides, proteínas,

*Autor para correspondencia: Sara Monzerrat Ramírez Olvera
Correo-e: maylin.perez@cigb.edu.cu
Recibido: 6 de enero de 2023
Aceptado: 2 de enero de 2024
Publicado: 23 de febrero de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1929

antocianinas, carotenoides, betalaínas, esteroles, lignanos, saponinas y ácido ascórbico (Otálora *et al*., 2021; Barba *et al*., 2022; Manzanarez-Tenorio *et al*., 2022). Las hojas de cilantro contienen carbohidratos, flavonoides y compuestos fenólicos (Santos *et al*., 2014; Nguyen *et al*., 2020; Hassanein *et al*., 2021). Así como el terpeno limoneno (López-Martínez *et al*., 2023).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta en el crecimiento y concentración nutrimental de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Parris, a la aplicación de extractos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de plántulas

Semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivar Parris, tipo romana, se colocaron en turba empleada como sustrato y contenida en charolas de poliestireno de 200 cavidades, previamente desinfectadas, mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 5 %, a dosis de 50 mL L^{-1}, durante 2 min. A los 30 d después de la siembra, se trasplantaron las plántulas.

Manejo del experimento

Las plántulas de lechuga de 30 d de edad, se transfirieron a bolsas de polietileno negro de 30 x 30 cm, en cuyo interior contenían tezontle de 12 mm. La nutrición se realizó con base en la solución nutritiva universal de Steiner (1984). Cada 24 h se suministraron 100 mL de solución nutritiva por bolsa.

A los 7 d después del trasplante, se asperjaron a las hojas 200 mL de cada tratamiento, durante 28 d en periodos de 7 d. Los tratamientos consistieron en extractos acuosos de hojas de cilantro, y cladodios de nopal a razón de 400 g de cladodios frescos de nopal, 200 g de hojas frescas de cilantro, por separado en 1 L de agua destilada, mismas que se dejaron macerar durante 1 h, y se filtraron en papel filtro de poro grueso (20 µm). Del cada extracto obtenido se tomaron 80, 120 y 160 mL, se diluyeron en 1 L de agua destilada, y se asperjaron a las hojas. El tratamiento testigo consistió en la aspersión de agua destilada.

Variables de crecimiento

Siete días después del inicio de tratamientos, se registró la altura de planta y el número de hojas durante 35 d, en periodos de siete días. La altura de la planta se midió con una regla de acero desde la base del tallo hasta la hoja más alta.

Variables nutrimentales

Las hojas de las lechugas, se colocaron en una estufa de aire forzado (HCF-125; Riossa, México), por 72 h a 70 °C. Después, el tejido seco se molió en un tamiz de malla 40, se tomaron 0.25 g de muestra, y se sometió a digestión húmeda con la mezcla de H_2SO_4:$HClO_4$ (2:1, v: v). Posteriormente, la muestra se aforó a 25 mL con agua desionizada y se filtró. Del extracto obtenido se determinó la concentración de macro y micronutrimentos, en un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado (Varian ICP OES 725-ES; Mulgrave, Australia). La concentración de N, se determinó por el método micro-Kjeldahl.

Análisis estadístico

Los tratamientos evaluados, se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza, y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey (Tukey, $P \leq 0.05$), para lo cual se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2009).

RESULTADOS

Extracto de nopal en el crecimiento y concentración nutrimental de plantas de lechuga

La altura de planta y el número de hojas no fueron influenciadas por la aplicación foliar de los extractos acuosos de nopal (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Altura de plantas de lechuga tratadas vía foliar con extracto de nopal.
Table 1. Height of lettuce plants, foliarly treated with nopal extract.

EANo (mL L^{-1})	Altura de planta (cm)				
	7 ddit	14 ddit	21 ddit	28 ddit	35 ddit
0	3.2 ± 0.3 a	3.1 ± 0.3 a	5.9 ± 0.3 a	7.3 ± 0.6 a	13.2 ± 0.8 a
80	3.5 ± 0.4 a	4.3 ± 0.5 a	6.3 ± 0.5 a	7.9 ± 0.4 a	13.4 ± 0.7 a
120	3.4 ± 0.5 a	4.5 ± 0.5 a	5.8 ± 0.6 a	7.1 ± 0.5 a	13.2 ± 0.1 a
160	3.3 ± 0.5 a	4.1 ± 0.5 a	6.2 ± 0.6 a	7.3 ± 0.6 a	13.3 ± 0.7 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EANo: extracto acuoso de nopal; ddit: días después del inicio de tratamientos.

Tabla 2. Número de hojas por planta en lechuga tratada con extracto de nopal vía foliar.
Table 2. Number of leaves per plant in lettuce, folirarly treated with nopal extract.

EANo (mL L^{-1})	Número de hojas				
	7 ddit	14 ddit	21 ddit	28 ddit	35 ddit
0	4.1 ± 0.3 a	5.3 ± 0.4 a	6.5 ± 0.5 a	6.1 ± 0.9 a	7.2 ± 0.6 a
80	4.7 ± 0.4 a	5.2 ± 0.4 a	6.6 ± 0.5 a	7.1 ± 0.6 a	7.1 ± 0.7 a
120	4.6 ± 0.5 a	5.0 ± 0.4 a	5.9 ± 0.7 a	6.7 ± 0.6 a	7.0 ± 0.5 a
160	4.1 ± 0.5 a	5.3 ± 0.4 a	6.3 ± 0.5 a	7.3 ± 0.6 a	7.4 ± 0.6 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EANo: extracto acuoso de nopal; ddit: días después del inicio de tratamientos.

Respecto a la concentración de macronutrimentos en hojas de lechuga (Tabla 3), el extracto acuso de nopal a una dosis de 160 mL L^{-1}, incrementó significativamente la concentración de fósforo en 60.79%. Por otro lado, la dosis 120 mL L^{-1} redujo la concentración de potasio en 23.41%, en relación al tratamiento testigo.

Las concentraciones de hierro y zinc se modificaron con la aplicación foliar de extracto acuoso de nopal (Tabla 4). Las dosis 80 y 120 mL L^{-1} aumentaron en más del doble la concentración de hierro. En tanto, que la aplicación de 80 mL L^{-1}

incrementó significativamente en 41.42 % la concentración de zinc, respecto al testigo.

Tabla 3. Concentración de macronutrimentos en hojas de plantas de lechuga, tratadas con extracto de nopal vía foliar.
Table 3. Macronutrients concentration in lettuce leaves, foliarly treated with nopal extract.

EANo (mL L^{-1})	N	P	K	Ca	Mg
	g kg^{-1} biomasa seca				
0	33.1 ± 1.8 a	2.3 ± 0.3 b	23.3 ± 0.3 a	6.2 ± 0.2 a	2.6 ± 0.2 a
80	33.5 ± 2.3 a	2.7 ± 0.1 b	20.5 ± 1.7 ab	7.2 ± 0.1 a	3.3 ± 0.1 a
120	30.6 ± 3.2 a	2.8 ± 0.4 b	17.8 ± 1.4 b	6.2 ± 0.4 a	2.7 ± 0.2 a
160	37.5 ± 4.0 a	3.7 ± 0.4 a	18.1 ± 0.1 ab	7.0 ± 0.4 a	2.1 ± 0.2 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EANo: extracto acuoso de nopal.

Tabla 4. Concentración de micronutrimentos en hojas de plantas de lechuga, tratadas con extracto de nopal vía foliar.
Table 4. Micronutrients concentration in lettuce leaves, foliarly treated with nopal extract.

EANo (mL L^{-1})	Fe	Cu	Mn	B	Zn
	mg kg^{-1} biomasa seca				
0	508.5 ± 20.4 b	5.34 ± 0.4 a	87.3 ± 2.3 a	38.8 ± 0.1 a	16.9 ± 1.0 b
80	1174.7 ± 103.1 a	7.67 ± 1.4 a	87.7 ± 2.0 a	45.0 ± 1.8 a	23.9 ± 0.9 a
120	749.6 ± 40.1 ab	6.00 ± 0.2 a	84.1 ± 1.4 a	39.8 ± 1.7 a	18.6 ± 1.2 b
160	1294.6 ± 217.6 a	8.67 ± 2.6 a	81.3 ± 9.5 a	37.7 ± 1.5 a	19.6 ± 1.3 ab

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EANo: extracto acuoso de nopal.

Extracto de cilantro en el crecimiento y concentración nutrimental de plantas de lechuga

La aspersión de extracto acuoso de cilantro no tuvo influencia en la altura de planta (Tabla 5), ni en el número de hojas por planta (Tabla 6), en ninguno de los días de evaluación.

La concentración de nitrógeno se redujo con la aplicación de 80 mL L^{-1} del extracto acuoso de cilantro en 25.55 %; por el contrario, con la adición de 160 mL L^{-1} incrementó la concentración de este elemento en 28.74 %, en relación con el tratamiento testigo. La concentración de fósforo aumentó en más del 100 % en todas las dosis de extracto evaluadas. Por otro lado, la concentración de potasio disminuyó en 49.07 % a la aplicación de 120 mL de extracto acuoso de cilantro L^{-1}. La aplicación de 80 y 120 mL L^{-1} aumentó en 47.35 y 46.22 % la concentración de magnesio (Tabla 7). Así también, la concentración de micronutrimentos se modificó después del tratamiento con extracto de cilantro (Tabla 8). La dosis 80 mL L^{-1} incrementó en más del doble la concentración de hierro, y en 34.67 % la concentración de manganeso. En tanto que, la concentración foliar de cobre incrementó significativamente después de la adición de 120 mL L^{-1}, y las dosis 120 y 160 mL L^{-1} incrementaron significativamente la concentración de boro y zinc.

Tabla 5. Altura de plantas de lechuga tratadas vía foliar con extracto de cilantro.
Table 5. Height of lettuce plants, foliarly treated with coriander extract.

EAC (mL L^{-1})	Altura de planta (cm)				
	7 ddit	14 ddit	21 ddit	28 ddit	35 ddit
0	3.2 ± 0.3 a	3.1 ± 0.3 a	5.8 ± 0.3 a	7.3 ± 0.6 a	13.2 ± 0.8 a
80	3.2 ± 0.3 a	4.4 ± 0.4 a	6.3 ± 0.4 a	7.9 ± 0.6 a	13.2 ± 0.9 a
120	3.7 ± 0.3 a	4.6 ± 0.3 a	6.1 ± 0.5 a	7.6 ± 0.5 a	13.4 ± 0.8 a
160	3.2 ± 0.3 a	4.2 ± 0.3 a	6.1 ± 0.4 a	7.7 ± 0.6 a	12.1 ± 0.7 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EAC: extracto acuoso de cilantro; ddit: días después del inicio de tratamientos.

Tabla 6. Número de hojas por planta en lechuga tratada con extracto de cilantro vía foliar.
Table 6. Number of leaves per plant in lettuce, foliarly treated with coriander extract.

EAC (mL L^{-1})	Número de hojas				
	7 ddit	14 ddit	21 ddit	28 ddit	35 ddit
0	4.1 ± 0.3 a	5.3 ± 0.4 a	6.5 ± 0.5 a	6.9 ± 0.9 a	7.2 ± 0.6 a
80	4.5 ± 0.4 a	5.0 ± 0.5 a	6.2 ± 0.5 a	7.3 ± 0.5 a	7.2 ± 0.7 a
120	4.3 ± 0.3 a	5.5 ± 0.6 a	6.3 ± 0.6 a	7.1 ± 0.6 a	7.4 ± 0.4 a
160	4.1 ± 0.3 a	5.0 ± 0.2 a	6.5 ± 0.4 a	7.5 ± 0.5 a	7.4 ± 0.7 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EAC: extracto acuoso de cilantro; ddit: días después del inicio de tratamientos.

Tabla 7. Concentración de macronutrimentos en hojas de plantas de lechuga, tratadas con extracto de cilantro vía foliar.
Table 7. Macronutrients concentration in lettuce leaves, foliarly treated with coriander extract.

EAC (mL L^{-1})	N	P	K	Ca	Mg
	g kg^{-1} biomasa seca				
0	33.9 ± 1.8 b	2.3 ± 0.3 b	23.3 ± 0.3 a	6.2 ± 0.2 a	2.6 ± 0.1 c
80	25.2 ± 0.2 c	4.1 ± 0.6 a	25.1 ± 0.2 a	6.5 ± 0.3 a	3.9 ± 0.1 a
120	33.5 ± 1.1 b	6.7 ± 0.3 a	11.9 ± 0.5 b	5.9 ± 0.2 a	3.9 ± 0.2 ab
160	43.6 ± 0.4 a	5.4 ± 0.6 a	24.2 ± 0.7 a	5.1 ± 0.3 a	2.9 ± 0.1 bc

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EAC: extracto acuoso de hojas de cilantro.

Tabla 8. Concentración de micronutrimentos en hojas de plantas de lechuga, tratadas con extracto de cilantro vía foliar.
Table 8. Micronutrients concentration in lettuce leaves, foliarly treated with coriander extract.

EAC (mL L^{-1})	Fe	Cu	Mn	B	Zn
	mg kg^{-1} biomasa seca				
0	508.5 ± 20.4 b	5.3 ± 0.4 b	87.4 ± 2.4 b	38.8 ± 0.1 b	16.9 ± 1.1 b
80	1196.6 ± 14.3 a	6.1 ± 0.4 ab	117.7 ± 0.4 a	34.1 ± 0.8 b	17.9 ± 0.2 b
120	749.9 ± 34.4 b	8.7 ± 0.4 a	91.3 ± 0.5 b	56.1 ± 1.2 a	29.1 ± 0.6 a
160	714.1 ± 3.5 b	6.7 ± 0.1 b	77.9 ± 2.5 b	51.3 ± 0.2 a	25.5 ± 0.6 a

Medias ± DE con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). EAC: extracto acuoso de hojas de cilantro.

DISCUSIÓN

Los bioestimulantes a base de extractos vegetales, son una alternativa en la producción vegetal (Zulfiqar *et al*., 2020). Su aplicación a plantas, mejora la división celular, el crecimiento, la absorción y eficiencia en el uso de nutrimentos (Ashraf *et al*., 2016; Posmyk, 2016).

La aspersión de los extractos acuosos de hojas de cilantro y cladodios de nopal a plantas de lechuga, no modificaron la altura de planta, ni el número de hojas. En contraparte, se ha reportado que otros extractos vegetales, como el extracto de hojas de moringa, incrementa el crecimiento vegetal, al aumentar la división celular, relacionado con las altas concentraciones de zeatina presentes en el extracto (Abd El–Hamied y El- Amary, 2015).

Los extractos vegetales evaluados en esta investigación, modificaron la concentración de macro y micronutrimentos en las hojas de lechuga. Lo cual puede deberse a la liberación de los nutrimentos presentes en los extractos, y la absorción por las hojas (Posmyk, 2016). Además de la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, carotenoides, proteínas, saponinas, ácido ascórbico, y fitohormonas (Elzaawely *et al*., 2018; Nguyen *et al*., 2020; Hassanein *et al*., 2021), que pueden influir en el transporte de los nutrimentos esenciales.

El género Opuntia se caracteriza por presentar mucílagos en sus cladodios, los cuales forman redes capaces de retener agua (Saag *et al*., 1975), debido a la presencia de grupos hidroxilo con alta capacidad de unión al agua. Su aplicación a las hojas modifica las relaciones hídricas de la planta, y la transpiración de las hojas (Clarke *et al*., 1979), por lo que su aplicación pudo influir en la translocación de elementos esenciales.

De forma similar, la aplicación de otros extractos vegetales ha incrementado la concentración de nutrimentos. La aspersión del extracto de hojas de moringa a plantas de mandarina, aumentó la concentración de N, P, K, Ca, Mn y Zn en hojas (Nasir *et al*., 2016), y la aplicación del el extracto acuoso de ajo, incrementó la concentración de N, P, K, Ca y Mn en plantas de pepino (Xiao *et al*., 2013).

La concentración de Mg en hojas de lechuga, aumentó después de la aplicación del extracto de cilantro. De forma similar, se ha reportado que el extracto de moringa incrementa la concentración de Mg, debido al incremento en la síntesis de clorofila (Ashraf *et al*., 2016).

Los dos extractos evaluados en esta investigación, incrementaron la concentración de P y Zn, lo cual puede estar relacionado a las concentraciones de ácido ascórbico presentes en los extractos. Al respecto, se ha informado una correlación positiva entre el ácido ascórbico y la concentración de P y Zn (Nasir *et al*., 2016).

Diversos extractos vegetales, han mostrado efectos positivos en la reducción de radicales libres, e incrementos en la concentración y actividad de enzimas antioxidantes (Ashraf *et al*., 2016; Posmyk, 2016). En esta investigación la aplicación del extracto de cilantro incrementó la concentración de Fe, Cu, Mn y Zn, los cuales son cofactores de la enzima superóxido dismutasa (SOD), una de las enzimas antioxidantes de mayor importancia, en la detoxificación de radicales libres (Culotta *et al*., 2006).

Los bioestimulates derivados de plantas, son una alternativa en la producción agrícola, al mejorar el crecimiento, rendimiento, y la eficiencia en el uso de nutrimentos. Además de incrementar concentración de nutrimentos en el tejido vegetal, lo cual es de suma importancia en métodos de biofortificación agronómica (Prasad y Shivay, 2020).

No obstante, es necesario continuar la investigación en esta área, con el fin de analizar los mecanismos fisiológicos y moleculares que permitan explicar las respuestas observadas en esta investigación.

CONCLUSIONES

La aspersión de los extractos acuosos de hojas de cilantro y cladodios de nopal, a plantas de lechuga cv. Parris, no modifican la altura de planta ni el número de hojas, e incrementan la concentración de fósforo. Por otro lado, la aspersión del extracto de cladodios de nopal, aumenta la concentración de hierro y zinc; y el extracto de cilantro aumenta la concentración de N, P, Mg, Fe, Cu, Mn, B y Zn, en hojas de lechuga. El extracto de nopal y cilantro disminuyen la concentración de potasio. La aspersión de extractos acuosos de cilantro y nopal no modifica el crecimiento y altera la concentración de macro y micronutrimentos en hojas de lechuga cv. Parris.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCES

Abd El–Hamied, S.A. y El-Amary, E.I. 2015. Improving growth and productivity of "pear" trees using some natural plants extracts under north sinai conditions. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 8: 1-9.

Ali, E.F., Hassan, F.A.S. y Elgimabi, M. 2018. Improving the growth, yield and volatile oil content of *Pelargonium graveolens* L. Herit by foliar application with moringa leaf extract through motivating physiological and biochemical parameters. South African Journal of Botany. 119: 383-389.

Ali, M., Cheng, Z.H., Hayat, S., Ahmad, H., Ghani, M.I. y Tao, L.I.U. 2019. Foliar spraying of aqueous garlic bulb extract stimulates growth and antioxidant enzyme activity in eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Integrative Agriculture. 18: 1001-1013.

Ashraf, R., Sultana, B., Iqbal, M. y Mushtaq, M. 2016. Variation in biochemical and antioxidant attributes of *Raphanus sativus* in response to foliar application of plant leaf extracts as plant growth regulator. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 14: 1-8.

Barba, F.J., Garcia, C., Fessard, A., Munekata, P.E.S, Lorenzo, J. M., Aboudia, A., Ouadiad, A. y Remize, F. 2022. *Opuntia ficus indica* edible parts: A food and nutritional security perspective. Food Reviews International. 38: 930-952.

Clarke, A.E., Anderson, R.L. y Stone, B.A. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry. 18: 521-540.

Culotta, V.C., Yang, M. y O'Halloran, T.V. 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1763: 747-758.

Culver, M., Fanuel, T. y Chiteka, A.Z. 2012. Effect of moringa extract on growth and yield of tomato. Greener Journal of Agricultural Sciences. 2: 207-211.

Elzaawely, A.A., Ahmed, M.E., Maswada, H.F., Al-Araby, A.A. y Xuan, T.D. 2018. Growth traits, physiological parameters and hormonal status of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with garlic cloves extract. Archives of Agronomy and Soil Science. 64: 1068-1082.

Hassanein, R.A., Hussein, O.S., Abdelkader, A.F., Farag, I.A., Hassan, Y.E. y Ibrahim, M. 2021. Metabolic activities and molecular investigations of the ameliorative impact of some growth biostimulators on chilling-stressed coriander (*Coriandrum sativum* L.) plant. BMC Plant Biology. 21: 1-23.

Hernández-Becerra, E., Aguilera-Barreiro, D.A., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E. y Rodriguez-Garcia, M.E. 2022. Nopal cladodes (*Opuntia Ficus Indica*): Nutritional properties and functional potential. Journal of Functional Foods. 95: 105183.

López-Martínez, S., Chan-Jiménez, J.E., Hernández-López, E.S. y Rodríguez-Luna, A.R. 2023. Oreganón, perejil, cilantro, hierbabuena y albahaca a través de difracción de rayos x. Biotecnia. 25: 113-124.

Manzanarez-Tenorio, L.E., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Márquez-Ríos, E., Del-Toro-Sánchez, C.L. y Suárez-Jiménez, G.M. 2022. Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales de nopal morado (*Opuntia gosseliniana*) en dos etapas de coloración. Biotecnia. 24: 101-106.

Mkindi, A.G., Tembo, Y.L., Mbega, E.R., Smith, A.K., Farrell, I.W., Ndakidemi, P.A., Stevenson, P.C. y Belmain, S.R. 2020. Extracts of common pesticidal plants increase plant growth and yield in common bean plants. Plants. 9: 149.

Mohammadipour, N. y Souri, M.K. 2019. Beneficial effects of glycine on growth and leaf nutrient concentrations of coriander (*Coriandrum sativum*) plants. Journal of Plant Nutrition. 42: 1637-1644.

Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., Zeroual, Y. y Hicham, E.A. 2020. Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. Scientific Reports. 10: 1-12.

Nasir, M., Khan, A.S., Basra, S.A. y Malik, A.U. 2016. Foliar application of moringa leaf extract, potassium and zinc influence yield and fruit quality of 'Kinnow'mandarin. Scientia Horticulturae. 210: 227-235.

Ndubuaku, U.M., Uchenna, N.V., Baiyeri, K. P. y Ukonze, J. 2015. Anti-nutrient, vitamin and other phytochemical compositions of old and succulent moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaves as influenced by poultry manure application. African Journal of Biotechnology. 14: 2502-2509.

Nguyen, D.T., Kitayama, M., Lu, N. y Takagaki, M. 2020. Improving secondary metabolite accumulation, mineral content, and growth of coriander (*Coriandrum sativum* L.) by regulating light quality in a plant factory. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 95: 356-363.

Otálora, M.C., Wilches-Torres, A., y Castaño, J.A.G. 2021. Extraction and physicochemical characterization of dried powder mucilage from *Opuntia ficus-indica* Cladodes and *Aloe vera* leaves: a comparative study. Polymers. 13: 1689.

Prabhu, M., Kumar, A.R. y Rajamani, K. 2010. Influence of different organic substances on growth and herb yield of sacred basil (*Ocimum sanctum* L.). Indian Journal of Agricultural Research. 44: 48-52.

Prasad, R. y Shivay, Y.S. 2020. Agronomic biofortification of plant foods with minerals, vitamins and metabolites with chemical fertilizers and liming. Journal of Plant Nutrition. 43: 1534-1554.

Posmyk, M.M. y Szafrańska, K. 2016. Biostimulators: a new trend towards solving an old problem. Frontiers in Plant Science. 7: 748.

Saag, L.M.K., Sanderson, G.R., Moyna, P. y Ramos, G. 1975. Cactaceae mucilage composition. Journal of the Science of Food and Agriculture. 26: 993-1000.

Santos, J., Herrero, M., Mendiola, J.A., Oliva-Teles, M.T., Ibáñez, E., Delerue-Matos, C. y Oliveira, M.B.P.P. 2014. Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. LWT-Food Science and Technology. 59: 101-107.

SAS, Institute Inc. 2009. SAS User´ s guide. Release 8.1. (Eds). SAS Institute, Inc. Cary, NC.

Steiner A.A. 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings of the Sixth International Congress on Soilless Culture, Wageningen, Netherlands. 633-650.

Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Komla, M.G. y Mariod, A.A. 2019. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) as a source of bioactive compounds. En Wild fruits: Composition, nutritional value and products. Mariod A.A (ed.), pp 333-358. Springer Nature Switzerland. Cham, Switzerland.

Xiao, X., Cheng, Z., Meng, H., Liu, L., Li, H. y Dong, Y. 2013. Intercropping of green garlic (*Allium sativum* L.) induces nutrient concentration changes in the soil and plants in continuously cropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) in a plastic tunnel. PLoS One. 8: e62173.

Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H. y Munné-Bosch, S. 2020. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. Plant Science. 295: 110194.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

De la pantalla al plato: relaciones causales entre la percepción de la utilidad del e-learning, la ansiedad, la actividad física y los hábitos de alimentación saludables en estudiantes universitarios

From Screen to Plate: causal relationships between the perception of the usefulness of e-learning, anxiety, physical activity, and healthy eating habits in university students

Eduardo Alberto Gómez-Infante[1], Claudia Selene Cuevas-Castro[2], María Grethel Ramírez-Siqueiros[2], Pablo Gutiérrez-García[2] and Roberto Andrés González-Fimbres*[2]

[1] Universidad Estatal de Sonora, Licenciatura en Nutrición Humana. Hermosillo, Sonora, México.

[2] Universidad Estatal de Sonora, Licenciatura en Entrenamiento Deportivo. Tel.: +52 6622339060. Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the relationship between the perceived usefulness of e-learning, anxiety, physical activity, and eating habits during the COVID-19 lockdown in university students. Methodology: A cross-sectional study involving 102 health undergraduate students (23 men, 79 women, average age 22.32 years). They responded to surveys on the perception of e-learning, eating habits, physical activity, and anxiety. Results: Simple linear regression models show that the perceived usefulness of e-learning predicts trait anxiety ($F_{(1,100)} = 9.13$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.084$) and state anxiety ($F_{(1,100)} = 11.66$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.104$). In turn, trait anxiety ($F_{(1,100)} = 8.35$, $p = 0.01$, $R^2 = 0.078$) and state anxiety ($F_{(1,100)} = 6.55$, $p < 0.05$, $R^2 = 0.062$) predict healthy eating habits. Conclusions: A positive perception of e-learning decreases anxiety. High levels of anxiety are associated with poorer eating habits. This indicates that reducing anxiety can improve eating habits.

Keywords: Mental health; Virtual education; College students; Pandemic; Eating behaviors.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la relación entre la percepción de utilidad del e-learning, ansiedad, actividad física y hábitos alimenticios durante el confinamiento por COVID-19 en estudiantes universitarios. Metodología: Estudio transversal en 102 alumnos de licenciatura en salud (23 hombres, 79 mujeres, edad promedio 22.32 años). Respondieron encuestas sobre la percepción de e-learning, hábitos alimenticios, actividad física y ansiedad. Resultados. Los modelos de regresión lineal simple muestran que la percepción de utilidad de e-learning predice la ansiedad rasgo ($F_{(1,100)} = 9.13$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.084$) y estado ($F_{(1,100)} = 11.66$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.104$), y a su vez, la ansiedad rasgo ($F_{(1,100)} = 8.35$, $p = .01$, $R^2 = 0.078$) y estado ($F_{(1,100)} = 6.55$, $p < 0.05$, $R^2 = 0.062$) son predictoras de hábitos de alimentación saludable. Conclusiones: La percepción positiva del e-learning disminuye la ansiedad. Niveles altos de ansiedad se asocian con peores hábitos alimenticios. Esto indica que reducir la ansiedad puede mejorar los hábitos alimenticios.

Palabras clave: salud mental; educación virtual; estudiantes universitarios; pandemia; comportamiento alimentario.

INTRODUCCIÓN

En marzo de 2020, México enfrentó el cierre de instituciones educativas debido a la pandemia por COVID-19. Esta medida llevó a una transición hacia la educación en línea (e-learning) en todos los niveles, incluido el superior. Esta implementación enfrentó varios desafíos, ya que numerosas escuelas carecían de preparación para el cambio y no todas las familias disponían de recursos adecuados, como conexión a internet y dispositivos (García, 2021). Tanto docentes como estudiantes enfrentaron obstáculos como conexión a internet inestable, problemas de seguridad, recursos pedagógicos limitados, ruidos ambientales y escasez de equipos (de Oliveira *et al.*, 2020). Aunque la educación en línea tiene ventajas como la grabación de video, almacenamiento en la nube y compartición de archivos (de Oliveira *et al.*, 2020), en carreras de ciencias de la salud la mayoría de los estudiantes reportó descontento debido a la falta de interacción en persona, la pérdida de señales de comunicación no verbal y otros factores que no pueden ser replicados virtualmente (Al-Azzam *et al.*, 2020).

En contextos internacionales como Arabia Saudita, los estudiantes de ciencias manifestaron preocupación por la infraestructura y la capacitación de los docentes en métodos en línea (Bawaneh, 2021). Sin embargo, cuando los estudiantes percibieron accesibilidad a herramientas en línea, compromiso y adaptabilidad en las clases virtuales, la aceptación de e-learning aumentó (Al-Azzam *et al.*, 2020). Por ejemplo, en Estados Unidos, los estudiantes universitarios consideraron que los docentes utilizaron las clases virtuales eficazmente, aunque expresaron emociones negativas como incertidumbre, ansiedad y nerviosismo (Murphy *et al.*, 2020). Un estudio en Arabia Saudita, en una zona de alto estatus socioeconómico, reveló que el 80 % de los estudiantes encontró las clases virtuales más convenientes, el 66 % estaba satisfecho con el aprendizaje en línea, el 60 % se sentía más seguro en el entorno virtual y el 59 % consideraba que el aprendizaje remoto podría sustituir a la educación presencial (Rezaul y Hasan, 2020). Esto sugiere que la satisfacción con las clases virtuales está influenciada por diversos factores, incluyendo la percepción de las demandas académicas, la carga de trabajo, el acceso a recursos tecnológicos, la competencia de los

*Autor para correspondencia: Roberto Andrés González-Fimbres
Correo-e: roberto.gonzalez@ues.mx
Recibido: 12 de enero de 2024
Aceptado: 22 de febrero de 2024
Publicado: 1 de abril de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2230

docentes en estrategias virtuales y el apoyo técnico (Hassan *et al*., 2021).

La situación de contingencia también exacerbó la ansiedad (Urzúa *et al*., 2020), definida como un estado de inquietud que se manifiesta con síntomas psicofisiológicos que incrementan la percepción de amenaza o peligro (Bandelow *et al*., 2022). Cuando la intensidad y frecuencia de estos síntomas sobrepasan ciertos umbrales clínicos, se categoriza como un trastorno, lo cual puede conducir a un deterioro significativo en la calidad de vida de una persona (Clark *et al*., 2017). En México, se ha documentado una ansiedad severa entre los familiares de pacientes hospitalizados a causa de COVID-19, atribuida a la sensación de incapacidad para manejar la preocupación (Ruiz-Aguilar *et al*., 2021). Además, se ha observado que el confinamiento provocó mayor irritabilidad, insomnio, deterioro en rendimiento escolar y laboral (Brooks *et al*., 2020). Por ello, es crucial identificar a aquellos en riesgo de desarrollar trastornos mentales como resultado de estas circunstancias (Markiewicz-Gospodarek *et al*., 2022). Sin embargo, en el contexto universitario en general se encontraron niveles de ansiedad de moderados a bajos durante la contingencia por COVID-19 (Chávez Márquez, 2021). Lo anterior se conjuga con los problemas asociados al estilo de vida de los estudiantes universitarios, quienes suelen sufrir cambios como mayor demanda académica, menor actividad física (AF) y mayor ansiedad, acompañados de la tendencia a iniciar el consumo de sustancias nocivas y hábitos no saludables (Cardona-Gómez y Arango-Paternina, 2021; Intelangelo *et al*., 2022), que repercuten a nivel de su bienestar físico (Carek *et al*., 2011) y psicológico (Hanlon y Swords, 2019).

El comportamiento alimentario, influenciado por el contexto emocional y fisiológico, también se vio afectado durante la pandemia. El comportamiento alimentario es el conjunto de acciones asociadas a la selección, preparación, preferencias de ingesta, creencias y horarios en la toma de los alimentos (Márquez-Sandoval *et al*., 2014). Los modelos de alimentación y los estilos de vida de la población mundial han sido afectados últimamente por las técnicas de globalización y el urbanismo, lo que ha generado procesos de transiciones epidemiológicas y nutricionales (Mendoza-Balcazar y Biler-Reyes, 2021). El inicio de estudios universitarios implica cambios emocionales y fisiológicos derivados de un nuevo ambiente y mayor independencia familiar, lo que determina comportamientos y costumbres alimenticios (Gallardo-Escudero *et al*., 2015). Los horarios extendidos de dedicación y altos niveles de exigencia son un reto adicional para el mantenimiento de los hábitos de vida saludables (Ojeda *et al*., 2020). Esto puede dar paso a la alimentación emocional, es decir, comer como respuesta a una variedad de emociones negativas, como la ansiedad, la depresión, la ira y la soledad (González, 2018), ya que es aceptado que las emociones tienen un poderoso efecto en la elección de alimentos y hábitos alimenticios (González, 2018). Más allá, el confinamiento por COVID-19, además de afectar la salud mental de estudiantes universitarios, también puede provocar aumento en sedentarismo y prácticas alimentarias no saludables (Quintana-López *et al*., 2021). Lo que nos lleva a pensar que un aumento de la ansiedad por e-learning puede ser en detrimento de hábitos alimenticios saludables.

El confinamiento también exacerbó el sedentarismo en la población (Quintana-López *et al*., 2021). Actualmente, al menos un 60 % de la población mundial no realiza la actividad física necesaria para obtener los beneficios que ésta conlleva (OMS, 2018). Adicionalmente, un estudio muestra que el confinamiento por la pandemia de COVID-19 redujo los niveles de AF total en comparación con los niveles anteriores a esta (Maugeri *et al*., 2020), lo que significa que además de las afectaciones de salud física y mental, se suman las dificultades para que las personas se mantengan activas físicamente, pudiendo ser otro factor que afecte la salud global de la población. Estudios han propuesto que la implementación de programas de ejercicio disminuye significativamente síntomas en distintos trastornos de ansiedad (Jayakody *et al*., 2014), determinando que a mayores niveles de AF corresponden menores niveles de ansiedad y mayor bienestar (McMahon *et al*., 2017); efecto que se mantuvo durante periodos de contingencia por COVID-19 en China (Zhang *et al*., 2020). Un estudio encontró que las mujeres presentan mayores niveles de ansiedad que los hombres, sin embargo, resaltan un mejor efecto positivo de la AF ante la ansiedad, concluyendo que a mayor nivel de AF realizada (bajo, moderado, alto) se observan menores niveles de ansiedad en los participantes (Alsalhe *et al*., 2020).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar relaciones causales entre la percepción de utilidad de las clases virtuales, ansiedad rasgo y estado, actividad física y hábitos de alimentación durante el confinamiento por COVID-19 en alumnos universitarios. Los resultados proporcionarán información valiosa para mejorar las estrategias de educación en línea y apoyar el bienestar de los estudiantes en tiempos de crisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

El estudio utilizó un diseño de corte transversal, con alcance causal para examinar si la percepción de utilidad de e-learning es predictor de ansiedad, si ésta es mediada por la actividad física y si la ansiedad es predictora de hábitos saludables de alimentación.

Muestra

En el presente estudio se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. La muestra de este estudio estuvo compuesta por 102 alumnos (23 hombres y 79 mujeres, edad de 22.32 ± 1.48 años) de nivel licenciatura de distintas carreras de una universidad en Sonora, México. Éticamente, los métodos utilizados fueron inocuos e inofensivos, categorizándose la investigación como de mínimo riesgo de acuerdo con el artículo 17, fracción II del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud de México; por lo tanto, no se requirió la aprobación de un comité de ética. Todos los procedimientos se apegaron a la declaración de

Helsinki (Holm, 2013). Los sujetos participaron de manera voluntaria y libres de coerción. Se les explicó que los datos recabados serían estrictamente confidenciales y se utilizarían para obtener conclusiones estadísticas únicamente. Todos los participantes firmaron un formato de consentimiento informado, el cual podían revocar en cualquier momento.

Instrumentos

Percepción de utilidad de e-learning. Se generó un cuestionario modificado a partir del cuestionario de utilidad de aplicaciones móviles para la AF publicado por Aroni *et al.* (2017). A los sujetos se les presentaba una afirmación y ellos tenían que seleccionar una respuesta en cinco niveles de una escala tipo Likert siendo 5 = "totalmente de acuerdo", 4 = "de acuerdo", 3 = "ni de acuerdo ni en desacuerdo", 2 = "en desacuerdo", 1 = "totalmente en desacuerdo". El cuestionario está conformado por 8 ítems: 1) Las clases sincrónicas por videoconferencia me ayudan a adquirir los conocimientos teóricos de las clases que estoy tomando. 2) Las clases sincrónicas por videoconferencia me ayudan para mejorar mi desempeño académico. 3) Las clases sincrónicas por videoconferencia son útiles para atender mis clases cuando no pueden ser presenciales. 4) Las clases sincrónicas por videoconferencia me ayudan a continuar con mis estudios de licenciatura durante el periodo de contingencia y no abandonar. 5) Las clases sincrónicas por videoconferencia me provocan mejorar mis hábitos de estudio. 6) Las clases sincrónicas por videoconferencia me ayudan a reducir el ausentismo durante el semestre. 7) Las clases sincrónicas por videoconferencia me ayudan a tener un aprendizaje significativo. 8) Las clases sincrónicas por videoconferencia son adecuadas para obtener las competencias profesionales de mi carrera.

Niveles de actividad física. Se aplicó el cuestionario internacional de actividad física en su versión corta (IPAQs) validad en el contexto mexicano (Caravali-Meza *et al.*, 2016). El cuestionario arroja los niveles de actividad física que realizan los sujetos valorando la frecuencia en días, horas y minutos en los últimos siete días. Además, el instrumento permite la conversión de la actividad reportada a unidades metabólicas (METS) ejercidas por semana.

Alimentación saludable. Se utilizó el cuestionario para evaluar el comportamiento alimentario validado al contexto mexicano en población universitaria por Márquez-Sandoval *et al.* (Márquez-Sandoval *et al.*, 2014). El cuestionario consiste en 31 ítems con respuestas de opción múltiple. Se incluyen preguntas sobre selección, preparación, horarios de toma de alimentos, preferencias de ingesta, creencias y barreras al cambio. Las respuestas de los ítems pueden ser calificadas como "saludable" o "no saludable". Para la valoración cuantitativa se tomó el número final de respuestas saludables.

Ansiedad. Se aplicó el Inventario de Ansiedad Rasgo-Estado IDARE (Spielberg *et al.*, 1971) en su versión adaptada al español mexicano del STAI (State-Trait Anxiety Inventory). El análisis de fiabilidad de las escalas de ansiedad rasgo y estado arrojaron un alfa de Cronbach de 0.95 y 0.91respectivamente.

Procedimiento

Se invitó a participar al estudio a estudiantes entre sexto y octavo semestre de la carrera de Licenciatura en Nutrición Humana de la Universidad Estatal de Sonora. A los estudiantes que respondieron positivamente a la invitación se les citó a una reunión donde se les proporcionó toda la información necesaria para la participación en el estudio.

Todos los procedimientos consistieron en responder encuestas. Los tres instrumentos se adecuaron a un formato de formulario en línea (Google Forms) para ser contestado de forma digital y autoadministrada.

Las respuestas fueron descargadas y revisadas por los investigadores. En caso de encontrar instrumentos contestados de manera incorrecta o incompleta, se excluyeron del análisis final.

Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico SPSS (IBM Corp, EU, versión 25). Todos los datos descriptivos se presentan como media ± Desviación Estándar. Debido a que la muestra excede los 50 datos, para verificar la distribución normal se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las variables relacionadas con hábitos alimenticios saludables, actividad física y la percepción sobre la utilidad del e-learning no siguieron una distribución normal. Para lograrla, se les aplicó una transformación de rango normal. Para establecer la relación entre las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Para elaborar los modelos predictivos se utilizaron regresiones lineales simples. Todas las significancias estadísticas se establecieron a $p < .05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Los estadísticos descriptivos de las variables de estudio se presentan en la Tabla 1. Los análisis mostraron que existe una relación negativa entre las variables de percepción de utilidad de las clases en e-learning y la ansiedad; a su vez, la ansiedad se relaciona negativamente con los hábitos de alimentación saludable, como se muestra en la tabla 2.

Se calculó un modelo de regresión lineal simple con método de entrada intro para predecir el efecto de la percepción de utilidad de e-learning sobre la ansiedad rasgo y estado. La ecuación de regresión fue estadísticamente significativa $F_{(1,100)} = 9.13$, $p < 0.01$ y $F_{(1,100)} = 11.66$, $p < 0.01$ para ansiedad rasgo y estado respectivamente. Los valores de la R^2 fueron de 0.084 y 0.104 para ansiedad rasgo y estado respectivamente, lo que indica que el 8.4 % de cambio de la ansiedad rasgo, y el 10.4 % de la ansiedad estado, pueden ser explicados por el modelo que contiene la percepción de utilidad de e-learning. Las ecuaciones de regresión fueron 2.03 + (- 0.26 * e-learning) para ansiedad rasgo y 2.11 + (- 0.32 * e-learning) para ansiedad estado, donde la puntuación disminuye 0.26 y 0.32 de ansiedad rasgo y estado respectivamente por cada unidad de e-learning.

Debido a que la ansiedad rasgo y estado presentan multicolinealidad, se calcularon modelos de regresión simple

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las variables del estudio.
Table 1. Descriptive statistics of the study variables.

Variable	Min	Max	M ± DE	IC 95 %	Kolmogórov-Smirnov
Edad (años)	21	28	22.32 ± 1.48	22.03 – 22.61	0.78, $p < .01$
Actividad física (Kcal)	286	9373	3017.70 ± 2,276.50	2,551.41 – 3,483.96	0.83, $p = 0.12$
Hábitos saludables (U.A.)	13	36	26.06 ± 3.35	25.37 – 26.75	0.72, $p = 0.20$
Ansiedad rasgo (U.A.)	0.25	2.75	1.30 ± 0.58	1.18 – 1.42	0.72, $p = 0.20$
Ansiedad estado (U.A.)	0.00	2.80	1.19 ± 0.65	1.06 – 1.33	0.66, $p = 0.20$
Utilidad de e-learning (U.A.)	1.13	4.00	2.79 ± 0.63	2.66 – 2.92	0.17, $p = 0.20$

Nota. Min = valor mínimo, Max = valor máximo, M = media, DE = desviación estándar, IC = Intervalo de confianza.

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre el promedio académico, hábitos de alimentación saludable, ansiedad rasgo, estado y percepción de utilidad de e-learning.
Table 2. Correlation coefficients between academic average, healthy eating habits, trait anxiety, state, and perception of usefulness of e-learning.

Variables		1	2	3	4	5
1	HAS		**-0.28****	**-0.25***	-0.01	**0.21***
2	Ansiedad rasgo			**0.86****	-0.11	**-0.26****
3	Ansiedad estado				-0.05	**-0.29****
4	AF (Kcal)					0.14
5	U e-learning					

Nota. HAS = hábitos de alimentación saludable, AF = Actividad física, U e-learning = Percepción de utilidad de e-learning, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$.

para verificar el efecto de cada una de ellas en los hábitos alimenticios. Para la ansiedad rasgo la ecuación de regresión fue estadísticamente significativa $F_{(1,100)} = 8.35$, $p < 0.01$. El valor de la R^2 fue de 0.078, lo que indica que el 7.8 % de cambio de los hábitos alimenticios pueden ser explicados por el modelo. La ecuación de regresión fue 28.12 + (- 1.71 * ansiedad rasgo). La puntuación de hábitos alimenticios disminuye 1.71 por cada unidad de ansiedad rasgo.

Para la ansiedad estado la ecuación de regresión fue estadísticamente significativa $F_{(1,100)} = 6.55$, $p < 0.05$. El valor de la R^2 fue de 0.062, lo que indica que el 6.2 % de cambio de los hábitos alimenticios pueden ser explicados por el modelo. La ecuación de regresión fue 27.52 + (- 1.36 * ansiedad estado). La puntuación de hábitos alimenticios disminuye 1.44 por cada unidad de ansiedad rasgo.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la relación causal entre la percepción de utilidad de las clases virtuales, ansiedad rasgo y estado, actividad física y hábitos de alimentación durante el confinamiento por COVID-19 en alumnos universitarios. Se había hipotetizado que la percepción de utilidad de las clases virtuales es un predictor de los niveles de ansiedad, que éstos estaban regulados por la actividad física, y a su vez, que la ansiedad es un predictor de hábitos de alimentación saludable. Los hallazgos principales del presente estudio fueron las relaciones encontradas entre la percepción de utilidad de las clases virtuales con los niveles de ansiedad, tanto rasgo como estado y a su vez, la relación entre la ansiedad y los hábitos saludables de alimentación. Además, se encontraron que los modelos predictivos, aunque muestran tamaños de efecto pequeños, son estadísticamente significativos.

Uno de los objetivos del presente estudio fue verificar si la percepción de utilidad por parte de los alumnos de las clases virtuales durante la transición a e-learning predice la elevación de los niveles de ansiedad rasgo y estado.

Según González *et al.* (2018), los valores de referencia propuestos para el IDARE tanto de ansiedad rasgo como estado son: bajo < 1.0, medio de 1.0 a 1.7 y alto > 1.7. En el presente estudio los estudiantes participantes mostraron niveles medios de ansiedad rasgo (M = 1.30 ± 0.58) y ansiedad estado (1.19 ± 0.65). La contingencia por COVID-19 pudo haber sido un factor que propiciara estos valores, ya que representó para los alumnos enfrentar una situación estresante, además de una percepción de amenaza e incertidumbre (Arribathi *et al.*, 2021). El aislamiento, el distanciamiento social y el movimiento restringido pueden generar sentimientos de incertidumbre, soledad y miedo, lo que aporta a la sensación de ansiedad. Los estudiantes pudieron estar preocupados por inseguridad laboral y la tensión financiera debido a la recesión económica, lo que puede contribuir a aumentar el estrés. Además, el miedo a la infección y la preocupación por la salud de los seres queridos también juega un papel importante. Se ha reportado que las condiciones de salud mental preexistentes, especialmente los trastornos de ansiedad, se exacerbaron durante la contingencia (Sibley *et al.*, 2020). El acceso reducido a los servicios de salud mental debido a las limitaciones de los sistemas de salud empeoró aún más la situación. La interrupción en la rutina y las actividades físicas, y un aumento significativo en el tiempo frente a la pantalla, también influyeron (ten Velde *et al.*, 2021).

En el presente estudio se encontraron modelos predictivos significativos, pero con tamaños de efecto pequeños para ansiedad rasgo (R^2 = 0.084) y estado (R^2 = 0.104). Esto coincide con reportes de que las emociones más frecuentes de los alumnos durante la transición a e-learning fueron fue incertidumbre (59.5 %), seguido por ansiedad (50.7 %) y en tercer lugar nerviosismo (41.2 %), es decir, las tres más frecuentes fueron emociones negativas (Murphy *et al.*, 2020). Estos resultados también van en línea con lo señalado por Valizadeh (2021), quién mostró que la transición a e-learning provocada por la pandemia de COVID-19 puede ser una causa de ansiedad. Esta relación se puede explicar por varias razones, como son preferencias personales, falta

de conocimiento tecnológico, problemas de infraestructura tecnológica, preocupación porque otros vean el interior de su casa o escuchen las voces de su ambiente, ser grabados en las actividades, preocupación por largo uso de tecnología (Valizadeh, 2021).

Aunque las universidades debieron haber contado con plataformas educativas adecuadas para la transición a e-learning, una percepción baja de utilidad del sistema informático de la universidad puede causar elevación en la ansiedad de los alumnos (Murphy *et al.*, 2020). Esta situación representa un reto tecnológico al alumno, experimentar problemas técnicos, como fallas en software, conectividad a internet, o pocas habilidades técnicas aportan a la problemática. Otro factor puede ser la falta de percepción de autoeficacia de los alumnos en habilidades tecnológicas. Si los estudiantes no se sienten competentes o cómodos en un entorno de aprendizaje en línea, baja la percepción de utilidad del e-learning y es probable que experimenten niveles más altos de ansiedad. Los entornos tradicionales de aprendizaje en persona ofrecen a los estudiantes la oportunidad de interactuar cara a cara con sus maestros y compañeros. Por el contrario, el e-learning a veces puede crear sentimientos de aislamiento, reduciendo su utilidad percibida y aumentando potencialmente la ansiedad. Otra razón puede ser la preocupación de los estudiantes por el potencial impacto de e-learning en su rendimiento académico, esto lleva a percibir el aprendizaje electrónico como menos útil y, en consecuencia, experimentar una mayor ansiedad. La necesidad de adaptarse a nuevas estrategias de aprendizaje, métodos de enseñanza y tipos de evaluación que supone la transición a e-learning por la pandemia de COVID-19 puede aumentar la ansiedad de los estudiantes.

Otro objetivo del presente estudio fue verificar si los niveles de ansiedad predicen los hábitos alimenticios. En el presente estudio se encontraron modelos predictivos significativos con tamaños de efecto pequeños para ansiedad rasgo ($R^2 = 0.078$) y estado ($R^2 = 0.062$) como predictores de hábitos alimenticios. Los resultados del presente estudio coinciden con los reportado por Bedoya-Cardona y Vásquez-Caballero (2019), que reportan que los niveles de estrés aumentan si el estudiante se encuentra ante una situación inesperada, que exige gran esfuerzo o sobrepasa la capacidad de afrontamiento, y que a su vez puede ser valorada como amenazante o estimulante, como lo fue tener que llevar a cabo clases virtuales debido al confinamiento, que no se consideran útiles para su desarrollo académico. Los aumentos ansiedad pueden llevar a los alumnos a consumo de estimulantes (tabaco, cafeína, fármacos), alteraciones del sueño y la alimentación. Según Duran-Galdo y Mamani-Urrutia (2021), quienes encontraron que por las exigencias académicas en la educación superior, los alumnos son vulnerables a los cambios, como la transición a e-learninig, afectando los hábitos alimentarios, la actividad física y el estrés académico, por lo que es probable que los estudiantes universitarios puedan presentar hábitos alimentarios inadecuados, como consumo excesivo de alimentos.

La ansiedad puede alterar los hábitos saludables de alimentación por un fenómeno denominado alimentación emocional, donde las personas consumen alimentos por comodidad en lugar de hambre (Chami *et al.*, 2019). Es particularmente común tener antojos de alimentos con alto contenido de grasa, azúcar o salados, conocidos como "alimentos reconfortantes", durante los períodos de mayor ansiedad. Estos alimentos pueden estimular el sistema de recompensa del cerebro, brindando un alivio temporal de la ansiedad, pero a largo plazo pueden conducir a hábitos dietéticos poco saludables (Ferreira *et al.*, 2019). Otra razón son los patrones de alimentación alterados, lo que lleva a comidas irregulares y a comer en exceso (Kris-Etherton *et al.*, 2021). La ansiedad provoca la activación de la rama simpática del sistema nervioso autónomo lo que conduce a niveles elevados de secreción de cortisol. Esto puede estimular el hambre y el deseo de alimentos ricos en calorías, lo que contribuye a hábitos alimenticios poco saludables (Di Polito *et al.*, 2023). Las personas con altos niveles de ansiedad pueden comer rápidamente o no prestar atención a qué o cuánto están comiendo. Esto puede resultar en comer en exceso y elegir alimentos no saludables.

Contrario a lo esperado, en el presente estudio no se encontró relación entre niveles de AF y ansiedad. Esto difiere a lo reportado en la literatura científica, de que la AF tiene un impacto positivo en la reducción de la ansiedad en personas activas. El estudio de Morales-Beltrán *et al.* (2022) sugiere que la AF y el ejercicio regulares se relacionan con un mejor bienestar mental, incluida una reducción de los síntomas de ansiedad, incluso en situaciones de contingencia por COVID-19, donde la AF tiene un efecto modulador.

Durante la pandemia de COVID-19, la correlación usual entre la AF y la reducción de la ansiedad en universitarios pudo haber sido atenuada debido a varios factores. Uno de ellos es que los estudiantes pudieron haber experimentado niveles de estrés y ansiedad excepcionalmente altos debido a la incertidumbre sobre su futuro académico, preocupaciones sobre la salud, y el aislamiento social (Cao *et al.*, 2020), Por otra parte, durante el confinamiento se produjeron cierres de gimnasios y espacios deportivos, lo que pudo haber llevado a cambios en las rutinas de ejercicio de los estudiantes (Lesser y Nienhuis, 2020) y haber eclipsado los beneficios potenciales de la AF. Por otra parte, la relación entre la AF y la ansiedad puede ser influenciada por factores individuales como predisposiciones genéticas, historia de salud mental, y respuestas al estrés. Esto significa que la AF podría ser más efectiva para algunas personas que para otras en el manejo de la ansiedad (Herring *et al.*, 2010). Asimismo, la reducción en la interacción social, que es un componente significativo de la AF, podría haber afectado los beneficios en la salud mental (Aperribai *et al.*, 2020). Por lo tanto, un enfoque multifactorial es necesario para entender la complejidad de la relación entre actividad física y ansiedad en este contexto excepcional.

El hecho de que la ansiedad rasgo y estado presenten colinealidad provoca que no se puedan ingresar como

variables independientes en un modelo predictivo de regresión múltiple, lo que se considera como una limitación del estudio. Se vislumbran como futuras líneas de investigación explorar las causas por las que los niveles de AF no estuvieron relacionados con la ansiedad. Por otra parte, las relaciones encontradas entre percepción de utilidad de e-learning con ansiedad y esta a su vez con los hábitos alimenticios, abren la posibilidad de enfocarse en explorar estrategias específicas para mejorar la percepción de la utilidad de la educación en línea y examinar su impacto en la ansiedad y el bienestar general de los estudiantes.

CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente estudio evidencian la existencia de una relación significativa entre la percepción de utilidad de e-learning y los niveles de ansiedad, tanto rasgo como estado, así como entre los niveles de ansiedad y los hábitos alimenticios en la población estudiada. Los resultados sugieren que cuando los individuos perciben el e-learning como poco útil, es probable que se incrementen los niveles de ansiedad. A su vez, implica que niveles más altos de ansiedad pueden estar asociados con una mayor probabilidad de adoptar malos hábitos alimenticios.

Contrario a lo esperado, en el presente estudio no se encontró relación entre niveles de AF y ansiedad. Esto apunta a la necesidad de entender mejor los mecanismos por los que la AF puede modular la ansiedad y qué otros factores subyacentes pueden afectar esta relación.

Los resultados del presente estudio tienen implicaciones importantes para la formulación de políticas y estrategias de intervención en contextos educativos, especialmente en entornos de e-learning. Es fundamental que se implementen programas de apoyo psicológico y orientación nutricional para abordar estos aspectos de manera integral.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses de ningún tipo en la elaboración de este manuscrito.

REFERENCIAS

Al-Azzam, N., Elsalem, L. y Gombedza, F. 2020. A cross-sectional study to determine factors affecting dental and medical students' preference for virtual learning during the COVID-19 outbreak. *Heliyon*, *6*(12), e05704. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05704.

Alsalhe, T.A., Aljaloud, S.O., Chalghaf, N., Guelmami, N., Alhazza, D.W., Azaiez, F. y Bragazzi, N.L. 2020. Moderation effect of physical activity on the relationship between fear of COVID-19 and general distress: A pilot case study in Arabic countries. *Frontiers in Psychology*, *11*(9), 1-10. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.570085.

Aperribai, L., Cortabarria, L., Aguirre, T., Verche, E. y Borges, Á. 2020. Teacher's physical activity and mental health during lockdown due to the COVID-2019 pandemic. *Frontiers in Psychology*, *11*(1), 1-14. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.577886.

Aroni, A., Castillo, E., Sousa, C., Machado, A., Filho, E. y Tenenbaum, G. 2017. Smartphone applications used for initiating and maintaining physical activity: An exploratory analysis. *Revista de Psicologia Del Deporte*, *27*(1), 89-95. https://doi.org/https://ddd.uab.cat/record/187801.

Arribathi, A.H., Suwarto, Miftakhu Rosyad, A., Budiarto, M., Supriyanti, D. y Mulyati. 2021. An analysis of student learning anxiety during the COVID-19 pandemic: A study in higher education. *Journal of Continuing Higher Education*, *69*(3), 192-205. https://doi.org/10.1080/07377363.2020.1847971.

Bandelow, B., Michaelis, S. y Wedekind, D. 2022. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(2), 93-107. https://doi.org/10.31887/ DCNS.2017.19.2/ bbandelow.

Bawaneh, A.K. 2021. The satisfaction level of undergraduate science students towards using E-Learning and virtual classes in exceptional condition Covid-19 crisis. *Turkish Online Journal of Distance Education*, *22*(1), 52-65. https://doi.org/10.17718/TOJDE.849882.

Bedoya-Cardona, E.Y. y Vásquez-Caballero, D.A. 2019. Estrés y funcionamiento cognitivo en estudiantes universitarios. *Revista Chilena de Neuropsicología*, *14*(1), 23-29. https://doi.org/10.5839/rcnp.2019.14.01.03.

Brooks, S.K., Webster, R.K., Smith, L.E., Woodland, L., Wessely, S., Greenberg, N. y Rubin, G.J. 2020. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: Rapid review of the evidence. *Lancet*, *395*(10227), 912-920. https://doi.org/10.2139/ssrn.3532534.

Cao, W., Fang, Z., Hou, G., Han, M., Xu, X., Dong, J. y Zheng, J. 2020. The psychological impact of the COVID-19 epidemic on college students in China. *Psychiatry Research*, *287*(2020), 1-5. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.112934.

Caravali-Meza, N.Y., Bacardí-Gascón, M., Armendariz-Anguiano, A.L. y Jiménez-Cruz, A. 2016. Validity of the IPAQ among Mexican adults with type 2 diabetes. *Journal of Negative & Positive Results*, *1*(3), 93-99. https://doi.org/10.19230/jonnpr.2016.1.3.1015.

Cardona-Gómez, J. y Arango-Paternina, C. 2021. Consumo de alcohol en estudiantes de educación superior: Análisis de redes sociales de amigos universitarios. *Retos*, *44*(2), 346-356. https://recyt.fecyt.es/index.php/retos/article/view/90679

Carek, P.J., Laibstain, S.E. y Carek, S.M. 2011. Exercise for the treatment of depression and anxiety. *International Journal of Psychiatry in Medicine*, *41*(1), 15-28. https://doi.org/10.2190/PM.41.1.c.

Chami, R., Monteleone, A.M., Treasure, J. y Monteleone, P. 2019. Stress hormones and eating disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *497*(1), 110349. https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.12.009.

Chávez Márquez, I.L. 2021. Ansiedad en universitarios durante la pandemia de COVID-19: un estudio cuantitativo. *Psicumex*, *11*(1), 1-26. https://doi.org/10.36793/psicumex.v11i1.420

Clark, L.A., Cuthbert, B., Lewis-Fernández, R., Narrow, W.E. y Reed, G.M. 2017. Three Approaches to Understanding and Classifying Mental Disorder: ICD-11, DSM-5, and the National Institute of Mental Health's Research Domain Criteria (RDoC). *Psychological Science in the Public Interest*, *18*(2), 72-145. https://doi.org/10.1177/1529100617727266.

de Oliveira, M., de Oliveira, R. y Correia, A. 2020. Will virtual replace classroom teaching? Lessons from virtual classes via Zoom in the times of COVID-19. *Journal of Advances in Education and Philosophy*, *04*(05), 208-213. https://doi.org/10.36348/jaep.2020.v04i05.004.

Di Polito, N., Stylianakis, A.A., Richardson, R. y Baker, K.D. 2023. Real-World Intake of Dietary Sugars Is Associated with Reduced Cortisol Reactivity Following an Acute Physiological Stressor. *Nutrients*, *15*(1), 1-18. https://doi.org/10.3390/nu15010209.

Durán-Galdo, R. y Mamani-Urrutia, V. 2021. Hábitos alimentarios, actividad física y su asociación con el estrés académico en estudiantes universitarios de primer año de ciencias de la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, *48*(3), 389-395. https://doi.org/10.4067/s0717-75182021000300389.

Ferreira, C., Pereira, H.B., Campos, F., de Souza, M.A. y Barbosa, C. 2019. Role of eating disorders-related polymorphisms in obesity pathophysiology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *20*(1), 115-125. https://doi.org/10.1007/s11154-019-09489-w.

Gallardo-Escudero, A., Muñoz, M.J., Planells, E.M. y López, I. 2015. La etapa universitaria no favorece el estilo de vida saludable en las estudiantes granadinas. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(2), 975-979. https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.8303.

García, L. 2021. COVID-19 y educación a distancia digital: preconfinamiento, confinamiento y posconfinamiento. *Revista Iberoamericana de Educación a Distancia*, *24*(1), 9-25. https://n9.cl/edp3.

González, M. 2018. Validación del Cuestionario de Comedor Emocional (CCE) en Chile. *Revista de La Sociedad Venezolana de Gastroenterologia*, *72*(1), 21-24. http://www.who.int/mediacentre/factshee.

Hanlon, H.R. y Swords, L. 2019. Overthinkers, attention-seekers and wallflowers: peer perceptions of clinical anxiety disorders in adolescence. *Journal of Public Mental Health*, *18*(1), 4-13. https://doi.org/10.1108/JPMH-07-2018-0049.

Hassan, S.U.N., Algahtani, F.D., Zrieq, R., Aldhmadi, B.K., Atta, A., Obeidat, R.M. y Kadri, A. 2021. Academic self-perception and course satisfaction among university students taking virtual classes during the covid-19 pandemic in the kingdom of Saudi-Arabia (KSA). *Education Sciences*, *11*(134), 1-14. https://doi.org/10.3390/educsci11030134.

Herring, M.P., O'Connor, P.J. y Dishman, R.K. 2010. The effect of exercise training on anxiety symptoms among patients: A systematic review. *Archives of Internal Medicine*, *170*(4), 321-331. https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.530.

Holm, S. 2013. Declaration of Helsinki. In *International Encyclopedia of Ethics* (pp. 1–4). https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444367072.wbiee230.

Intelangelo, L., Gutiérrez, N.M., Bevacqua, N., Mendoza, C., Guzmán-Guzmán, I.P. y Jerez-Mayorga, D. 2022. Effect of Confinement by COVID-19 on the Lifestyle of the University Population of Argentina: Evaluation of Physical Activity, Food and Sleep. *Retos*, *43*(1), 274-282. https://doi.org/10.47197/RETOS.V43I0.88461.

Jayakody, K., Gunadasa, S. y Hosker, C. 2014. Exercise for anxiety disorders: Systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, *48*(3), 187-196. https://doi.org/10.1136/bjsports-2012-091287.

Kris-Etherton, P.M., Petersen, K.S., Hibbeln, J.R., Hurley, D., Kolick, V., Peoples, S., Rodriguez, N. y Woodward-Lopez, G. 2021. Nutrition and behavioral health disorders: Depression and anxiety. *Nutrition Reviews*, *79*(3), 247-260. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa025.

Lesser, I.A. y Nienhuis, C.P. 2020. The impact of COVID-19 on physical activity behavior and well-being of Canadians. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(23), 1-12.

Markiewicz-Gospodarek, A., Górska, A., Markiewicz, R., Chilimoniuk, Z., Czeczelewski, M., Baj, J., Maciejewski, R. y Masiak, J. 2022. The Relationship between Mental Disorders and the COVID-19 Pandemic—Course, Risk Factors, and Potential Consequences. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(15), 1-18. https://doi.org/10.3390/ijerph19159573.

Márquez-Sandoval, Y.F., Salazar-Ruiz, E.N., Macedo-Ojeda, G., Altamirano-Martínez, M.B., Bernal-Orozco, M.F., Salas-Salvadó, J. y Vizmanos-Lamotte, B. 2014. Diseño y validación de un cuestionario para evaluar el comportamiento alimentario en estudiantes mexicanos del área de la salud. *Nutricion Hospitalaria*, *30*(1), 153-164. https://doi.org/10.3305/nh.2014.30.1.7451.

Maugeri, G., Castrogiovanni, P., Battaglia, G., Pippi, R., D'Agata, V., Palma, A., Di Rosa, M. y Musumeci, G. 2020. The impact of physical activity on psychological health during Covid-19 pandemic in Italy. *Heliyon*, *6*(6), e04315. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04315.

McMahon, E.M., Corcoran, P., O'Regan, G., Keeley, H., Cannon, M., Carli, V., Wasserman, C., Hadlaczky, G., Sarchiapone, M., Apter, A., Balazs, J., Balint, M., Bobes, J., Brunner, R., Cozman, D., Haring, C., Iosue, M., Kaess, M., Kahn, J. P., … y Wasserman, D. 2017. Physical activity in European adolescents and associations with anxiety, depression and well-being. *European Child and Adolescent Psychiatry*, *26*(1), 111-122. https://doi.org/10.1007/s00787-016-0875-9.

Mendoza-Balcazar, J. y Biler-Reyes, S.A. 2021. Factores socio-económicos y sus efectos en hábitos alimentarios durante la pandemia Covid- 19 año 2020-2021 en la Ciudad de Manta. *Revista Científica FIPCAEC*, *6*(3), 3-17. https://doi.org/https://doi.org/10.23857/fipcaec.v6i3.442.

Morales-Beltrán, R., Hernández-Cruz, G., González-Fimbres, R., Rangel-Colmenero, B., Zazueta-Beltrán, D. y Reynoso-Sánchez, L. 2022. La actividad física como moderador en la ansiedad asociada al COVID-19 en estudiantes universitarios. *Retos*, *45*(1), 796-806. https://recyt.fecyt.es/index.php/retos/article/view/92974.

Murphy, L., Eduljee, N.B. y Croteau, K. 2020. College Student Transition to Synchronous Virtual Classes during the COVID-19 Pandemic in Northeastern United States. *Pedagogical Research*, *5*(4), em0078. https://doi.org/10.29333/pr/8485.

Ojeda, M.M., Muñoz, J.J. y Menéndez, E.P. 2020. Hábitos de vida saludables y rendimiento escolar en estudiantes universitarios. *Revista de La Escuela de Ciencias de La Educación*, *2*(15), 34-44. https://doi.org/10.35305/rece.v2i15.544.

Quintana-López, V.A., Jesús, D.-L.K. de y Esther, M.-L.M. 2021. Conductas alimentarias de riesgo en estudiantes universitarios de la salud durante la pandemia por COVID-19. *Revista La Sociedad Académica*, *29*(58), 31-38. https://www.itson.mx/publicaciones/sociedad-academica/Documents/LSA 58_compressed.pdf#page=33.

Rezaul, M. y Hasan, M. 2020. Virtual Classes during COVID 19 Pandemic in Tertiary Level in Saudi Arabia: Challenges and Prospects from the Students' Perspective. *Asian EFL Journal*, *27*(5.1), 205-219.

Ruiz-Aguilar, C.A., Urdapilleta-Herrera, E.D.C. y Lara-Rivas, G. 2021. Ansiedad en familiares de pacientes con COVID-19 hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Neumologia y Cirugia de Torax*, *80*(2), 100-104. https://doi.org/10.35366/100990.

Sibley, C.G., Greaves, L.M., Satherley, N., Wilson, M.S., Overall, N.C., Lee, C.H.J., Milojev, P., Bulbulia, J., Osborne, D., Milfont, T.L., Houkamau, C.A., Duck, I.M., Vickers-Jones, R. y Barlow, F.K. 2020. Effects of the COVID-19 pandemic and nationwide lockdown on trust, attitudes toward government, and well-being. *American Psychologist*, *75*(5), 618-630. https://doi.org/10.1037/amp0000662.

Spielberg, C.D., González-Reigosa, F. y Martínez-Urrutia, Á. 1971. Develpement of the Spanish edition of the State-Trait Anxiety Inventory. *Interamerican Journal of Psychology*, *5*(1), 3-4. https://doi.org/10.4135/9781483365817.n1316.

ten Velde, G., Lubrecht, J., Arayess, L., van Loo, C., Hesselink, M., Reijnders, D. y Vreugdenhil, A. 2021. Physical activity behaviour and screen time in Dutch children during the COVID-19 pandemic: Pre-, during- and post-school closures. *Pediatric Obesity*, *16*(9), 1-7. https://doi.org/10.1111/ijpo.12779.

Urzúa, M.D.C., Rodríguez, D.P., Valencia, M.M. y Ruiz, R.E. 2020. Aprender ciencias experimentales mediante TIC en tiempos de covid-19: percepción del estudiantado. *Praxis & Saber*, *11*(27), e11447. https://doi.org/10.19053/22160159.v11.n27.2020.11447.

Valizadeh, M. 2021. Foreign Language Anxiety in Virtual Classrooms during the Covid-19 Pandemic in Turkey. *St. Theresa Journal of Humanities and Social Sciences*, *7*(1), 54-80.

Zhang, Y., Zhang, H., Ma, X. y Di, Q. 2020. Mental health problems during the COVID-19 pandemics and the mitigation effects of exercise: A longitudinal study of college students in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(10), 1-16. https://doi.org/10.3390/ijerph17103722.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Función pulmonar en paranadadores con lesión medular en Cali-Colombia. Serie de Casos

Lung function in para-swimmers with spinal cord injury in Cali-Colombia. Case series

Olga Lucía Hincapié-Gallón[1]✉, Juan Diego Angulo Viña[1]✉, Alexandra Hurtado Trujillo[1]✉, Isabella Reyes Gutierrez[1]✉, Maria Camila Sabogal Muñoz[1]✉, Stefanie Tonguino Rosero[1]*✉

[1] Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue describir algunas características de la función pulmonar de cuatro paranadores con lesión medular de Cali-Colombia. Se incluyeron cuatro deportistas de iniciación deportiva de para-natación con lesión medular de cualquier nivel neurológico, quienes firmaron el consentimiento informado. Se tomaron datos sociodemográficos, clínicos, deportivos, antropométricos, independencia funcional y función pulmonar mediante espirometría y movilidad torácica mediante la cirtometría. Los resultados evidencian cuatro paranadores entre 26 y 42 años, con niveles neurológicos entre T2-T4 y T10-T11. Ninguno de los casos presentó enfermedades respiratorias pre y post lesión, dos de los casos presentaron historial tabáquico. Los casos llevaban entre tres y doce meses practicando el deporte, todos con normopeso según IMC; con dependencia leve según Índice de Barthel. Además, presentaron valores entre 83 % y 93 % del valor predicho en la relación VEF1/CVF. La mejor toma de la movilidad torácica a nivel axilar estuvo entre 1,5 y 5,6 cm y a nivel xifoideo entre 1,5 y 2,5 cm. Se concluye que los sujetos no tuvieron alteraciones en la función pulmonar, que los deportistas con historial tabáquico y nivel de lesión más alto presentaron disminución en la movilidad torácica, el entrenamiento en agua puede otorgar beneficios a nivel pulmonar.

Palabras clave: Traumatismos de la Médula Espinal, Deportes Acuáticos, Deportes para Personas con Discapacidad, Mediciones del Volumen Pulmonar.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe some characteristics of pulmonary function in four para-swimmers with spinal cord injury from Cali-Colombia. Four paraswimmers with spinal cord injury of any neurological level who signed the informed consent form were included. Sociodemographic, clinical, athletic, anthropometric, functional independence and, pulmonary function by spirometry and thoracic mobility by cirtometry data were collected. The results show four patients between 26 and 42 years old, with neurological levels between T2-T4 and T10-T11. None of the cases had a history of respiratory diseases before or after the injury, two of the cases had a history of smoking. The cases had been practicing the sport for between three and twelve months, all with normal weight according to BMI; with mild dependence according to the Barthel Index. In addition, they presented FEV1/FVC values between 83 % and 93 % of predicted value. The best thoracic mobility was between 1.5 and 5.6 cm at the axillary level, and between 1.5 and 2.5 cm at the xiphoid level. It is concluded that the subjects had no changes in pulmonary function, that the athletes with a history of smoking and a higher level of injury presented a decrease in thoracic mobility, and that training in water can provide benefits at the pulmonary level.

Keywords: Spinal Cord Injuries, Water Sports, Sports for People with Disabilities, Lung Volume Measurements.

INTRODUCCIÓN

El deporte paralímpico es considerado como el fenómeno social de mayor desarrollo del siglo, debido a que, a lo largo de los años, ha logrado un importante nivel de crecimiento en cuanto a la participación activa de las personas en situación de discapacidad lo que, por ende, ha aumentado su visibilidad y reconocimiento.

Una de las patologias mas frecuentes que generan discapacidad es la lesión medular la cual es una alteración de la médula espinal que genera pérdida de sensibilidad y/o movilidad por debajo del nivel de la lesión (Brizuela Costa *et al*., 2016). Una vez instalado el daño, inician diferentes procesos fisiopatológicos en donde la necrosis celular, resultado del daño mecánico e isquémico, es predominante e inmediato (Gomez Garrido, 2014). Según el análisis situacional de salud del Valle del Cauca, hasta el 01 de agosto del 2022, el departamento contaba con 133,732 personas en condición de discapacidad, 32,416 de ellas, equivalente al 49 %, relacionadas con el movimiento del cuerpo, manos, brazos y piernas (Grupo Vigilancia En Salud Pública, 2023).

A pesar de los avances en estrategias de rehabilitación y calidad de vida, la lesión medular sigue siendo una de las alteraciones de mayor impacto tanto para el individuo como para su entorno por la gran discapacidad que provoca (Gomez Garrido, 2014). Por ello, la práctica del deporte es una forma en que las personas en situación de discapacidad afrontan de manera reconfortante y didáctica su condición, además de mejorar su calidad de vida (Muñoz Jimenez *et al*., 2017). El deporte de para-natación se considera un deporte adaptado en el cual participan atletas con discapacidad física u otras discapacidades (Reina *et al*., 2021), donde los individuos se clasifican en función de cómo afecta su discapacidad a la hora de practicar cada gesto deportivo (libre, espalda,

*Autor para correspondencia: Stefanie Tonguino Rosero[1]
Correo-e: stefanie.tonguino@endeporte.edu.co
Recibido: 17 de noviembre de 2023
Aceptado: 12 de enero de 2024
Publicado: 12 de enero de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2200

brazada o mariposa); los individuos con discapacidad física, entre ellos los deportistas con lesión medular, hacen parte de la clase deportiva S1 a S10, la cual integra lesiones completas e incompletas desde C5 hasta L5 (Reina *et al*., 2021).

Estos individuos han visto en él una forma de vida, lo que ha llevado a un esfuerzo de sí mismos y con ello el deseo de llegar a cumplir objetivos más grandes (Muñoz Jimenez *et al*., 2017). Sin embargo, a pesar de los múltiples beneficios que trae el deporte, el impacto a nivel respiratorio, originado por la disfunción en la mecánica ventilatoria, asociado a las afectaciones de la musculatura respiratoria, podría conducir a complicaciones en la función pulmonar específicamente en los valores del predicho de la espirometría simple y en la movilidad del tórax, lo que puede generar mayor esfuerzo físico (Gomez Garrido, 2014).

A pesar que la función pulmonar en paranadores con lesión medular ha sido escasamente estudiada, investigaciones evocan en deportes como baloncesto silla y paraatletismo, en los cuales se ha evidenciado que los volúmenes pulmonares presentan diferencias a favor de los paradeportistas en comparación con lesionados medulares que no practican deporte (Ternovoy *et al*., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un diseño: serie de casos en población de paranadores con lesión medular de Cali. Se tomó un grupo de muestra de 4 para-atletas por serie consecutiva de casos y se realizó una descripción uno a uno del comportamiento individual de cada caso. Las mediciones se llevaron a cabo en el mes de enero de 2023. La investigación tuvo aval del comité de ética de la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte #acta 40.07.247, se garantizó la confidencialidad y bajo ningún motivo se reveló la información sobre la investigación o sobre algún sujeto que participó en ella; todo lo anterior quedó registrado en el consentimiento informado que aprobó cada participante.

Los criterios de inclusión fueron deportistas de iniciación deportiva pertenecientes a la disciplina de para-natación, mayores de edad, de sexo masculino y femenino, con lesión medular de cualquier nivel neurológico, quienes hayan aceptado y firmado el consentimiento informado y que al momento de la evaluación no presentaran sintomatología respiratoria. Los criterios de exclusión fueron deportistas que en el momento del estudio presenten alguna enfermedad cardiovascular/respiratoria y que estuvieran practicando otro deporte adaptado. Se tomaron muestras en deportistas de iniciación deportiva con lesión medular de cualquier nivel neurológico, vinculados al deporte de para-natación de 2 entidades deportivas de Cali.

Los resultados reposan en un base de datos de excel lo cuales corresponden a las variables sociodemográficas, clínicas, deportivas, antropométricas, de la independencia funcional, características espirométricas y movilidad torácica. Para evaluar las características clínicas, se aplicó el International Spinal Cord Injury Pulmonar Basic Data Sat Form (Versión 1.0) en su versión en español. Además, se aplicó el índice Índice Paquete Año (IPA) para los casos con reporte de historia tabáquica. Para las variables antropométricas, se utilizó una balanza seca 813-plataforma amplia (kg) y una cinta métrica marca ANTHRO FLEX NA 305 (talla); con las tomas mencionadas anteriormente, se calculó el índice de masa corporal (IMC) y se clasificó de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. Para evaluar las características relacionadas con la independencia funcional se utilizó el índice de Barthel.

Para evaluar las características espirométricas, se aplicó la espirometría simple con un software disponible para computador (Easy on-PC), determinando la capacidad vital forzada (CVF), volumen espiratorio forzada en el primer segundo (VEF1) y la relación VEF1/CVF. Para la prueba, se le explicó al sujeto las indicaciones de la misma, se realizaron tres intentos con descansos entre cada uno, eligiendo la mejor toma. La movilidad torácica se evaluó por medio de la cirtometría con una cinta métrica marca ANTHRO FLEX NA 305 siguiendo el protocolo de Bockenhauer y cols (Bockenhauer *et al*., 2007), registrando el resultado en centímetros. Se tuvo en cuenta dos niveles de medición: cirtometría axilar a nivel del tercer espacio intercostal y quinto proceso espinoso torácico y cirtometría xifoidea a nivel de la apófisis xifoidea y décimo proceso espinoso torácico. Se realizaron tres intentos con descansos entre cada uno, eligiendo la mejor toma.

Es importante mencionar que la espirometria simple fue tomada por un especialista en el área de estas pruebas de función pulmonar. Para la medición de la movilidad torácica, para evitar sesgos de información, sólo un investigador realizó la toma y los demás se encargaron de verificar la posición de la cinta, la posición del sujeto, indicar los comandos verbales claros y la toma de datos en el formato de recolección de datos.

En cuanto al análisis de los resultados, se presentan de manera observacional, ya que esto permite explicar cada uno de los casos e ir de la generalidad a la individualidad. En términos generales, se presentan variables cuantitativas y cualitativas. Se realiza una descripción individual de cada uno de los participantes y luego una comparación general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se incluyeron cuatro para-deportistas en su mayoría de sexo masculino, con un promedio de edad de 32.7 años, de estrato socioeconómico entre dos y tres. Con respecto a la ocupación, dos de los casos siguieron ejerciendo sus labores en comparación pre y post lesión, uno de los casos debido al accidente quedó pensionado y el caso restante cambió su ocupación de empleado a independiente debido a la discapacidad. Todos los casos eran solteros y el nivel educativo destacado fue bachiller (Tabla 1).

Todos los deportistas presentaban niveles neurológicos de lesión entre T2-T4 y T10-T11; dos de los casos presentaban lesiones completas y dos lesiones incompletas. La fecha de lesión más antigua se presentó en el año 2016 y la más reciente en el año 2021. El mecanismo de lesión del caso número uno y tres se produjo por accidente de tránsito en

Tabla 1. Características sociodemográficas de los casos a estudio.
Table 1. Sociodemographic characteristics of study cases.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Características sociodemográficas				
Género	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino
Edad (años)	42	26	35	27
Estrato socioeconómico	3	2	3	3
Ocupación pre-lesión	Empleado	Deportista	Empleado	Ama de casa
Ocupación post-lesión	Pensionado	Deportista	Independiente	Ama de casa
Estado civil	Soltero	Soltero	Soltero	Soltera
Nivel educativo	Tecnólogo	Bachiller	Profesional	Bachiller

motocicleta, debido a un microsueño y colisión con automóvil, respectivamente. Mientras que el mecanismo de lesión del caso número dos y cuatro fue ocasionado por herida de arma de fuego, puntualmente por bala perdida e intento de robo. Según la International Spinal Cord Injury Pulmonar Basic Data Sat Form (Versión 1.0), ninguno de los casos presentó enfermedades pre y post lesión, ni necesidad de uso de asistencia ventilatoria, marcapasos, estimulador del nervio frénico o BI-PAP (Tabla 2).

El caso número dos era fumador activo al momento de la evaluación de cuatro cigarrillos diarios durante 7 años. El caso número tres fue ex-fumador de cinco cigarrillos diarios durante cinco años. Al índice tabáquico o índice paquete-año (IPA), los casos mencionados anteriormente presentaron grado de tabaquismo leve (tabla 2). En relación a esto, se sabe que el consumo activo y pasivo de tabaco tiene efectos sobre múltiples órganos, especialmente en el sistema respiratorio. Algunos estudios demostraron que los fumadores absorben componentes del humo del tabaco a través de las vías respiratorias y alvéolos, lo que conlleva a efectos adversos como el agravamiento del asma y función pulmonar reducida (Pulgar y Fernandez, 2019). Por lo tanto, el consumo del tabaco deja un efecto perjudicial sobre la función respiratoria, altera el parénquima pulmonar y la resistencia bronquial generando así una alteración funcional de la mecánica respiratoria.

Todos los casos pertenecían a la clase deportiva S5 (lesión completa por debajo de T1-T8, tetraplejia incompleta por debajo de C8) y S6 (paraplejia completa o polio por lesión por debajo de T9-L1, diplejía moderada, hemiplejia moderada). El caso número uno y dos llevaban un año en el deporte, practicaban cinco días a la semana durante tres horas al día. El caso número tres y cuatro llevaban tres meses, practicando dos días a la semana entre dos y cuatro horas (Tabla 3). Algunas investigaciones en nadadores convencionales, destacan que los factores de entrenamiento como periodo de entrenamiento y cantidad semanal de entrenamiento no influyen en la función pulmonar de los deportistas convencionales y son temas aún debatidos (Lazovic Popovic *et al*., 2016).

En promedio, el peso fue 61,8 kg, la envergadura fue 1.66 m y talla sentado 81,7. Según IMC, todos los casos se encuentran dentro de los rangos para clasificarse en normopeso (Tabla 4). Estos factores son aspectos debatidos ya que se desconoce si el aumento en los volúmenes pulmonares

Tabla 2. Características clínicas de los casos a estudio.
Table 2. Clinical characteristics of study cases.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Características clínicas				
Sintomatología respiratoria	No	No	No	No
Nivel neurológico ASIA	T6-T7	T2-T4	T7- T8	T10-T11
Clasificación ASIA	Incompleta	Incompleta	Completa	Completa
Fecha de lesión	30/10/19	23/08/16	14/06/21	01/08/21
Tiempo de lesión	3 años, 4 meses	6 años, 7 meses	1 año, 8 meses	1 año, 7 meses
Mecanismo de lesión	Accidente de tránsito	Herida por arma de fuego	Accidente de tránsito	Herida por arma de fuego
Enfermedad respiratoria pre-lesión medular	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Historia tabáquica	Nunca ha fumado	Si, fumador actual	Si, ex fumador	Nunca ha fumado
Año en que dejó de fumar o años fumados	No aplica	7 años	5 años	No aplica
Promedio de cigarrillos/día	No aplica	4 cigarrillos	5 cigarrillos	No aplica
Índice de Paquetes de Cigarrillos anuales (IPA)	No aplica	1.4	1.2	No aplica
Complicaciones respiratoria post - lesión	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Uso de asistencia ventilatoria, marcapasos, estimulador del nervio frénico o BI-PAP	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Tabla 3. Características deportivas de los casos a estudio.
Table 3. Sports characteristics of study cases.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Características de la práctica deportiva				
Deporte	Paranatación	Paranatación	Paranatación	Paranatación
Clase deportiva	S5	S5	S5	S6
Tiempo en el deporte	1 año	1 año	3 meses	3 meses
Día/semana de entreno	5	5	2	2
Hora/día de entreno	3	3	2	4
Deportista pre-lesión	Si	Si	Si	Si
Deporte practicado pre-lesión	Ciclismo	Natación	Fútbol	Fútbol
Logros deportivos	No	No	No	No
Competencias/año	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Tabla 4. Características antropométricas de los casos a estudio.
Table 4. Anthropometric characteristics of study cases.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Características antropométricas				
Peso (kg)	68.1	64.8	52	62.5
Envergadura (m)	1.66	1.77	1.63	1.59
Talla sentado (cm)	82.2	82.2	80	82.5
Índice de masa corporal (IMC)	24.8 normopeso	20.7 normopeso	19.6 normopeso	24.7 normopeso

está determinado por las características antropométricas o al entrenamiento (Lazovic Popovic *et al*., 2016).

En cuanto a la independencia funcional, tres casos requieren cuidador en casa siendo familiares cercanos quienes cumplen la labor. Según el Índice de Barthel, todos los casos presentaban dependencia leve con puntajes entre 70 y 80 puntos; las limitaciones más predominantes fueron deambulación y subir escaleras debido a la deficiencia en la movilidad de las extremidades inferiores (Tabla 5). Al respecto se conoce que la práctica del deporte favorece la independencia en las actividades de la vida diaria. Esta hipótesis concuerda con investigaciones cualitativas donde paranadores afirmaron "haber notado mejoras en su proceso de aceptación de la situación, superación del trauma e incluso en su motricidad y adaptación a la vida cotidiana con las limitaciones adquiridas" (Velasco Vanegas, 2019). En este sentido, el deporte se convierte para los paradeportistas en fuente de aprendizaje, adaptación y esfuerzo de sí mismos.

En la espirometría simple, a la relación VEF1/CVF, se evidenció que ninguno de los casos presentaron un patrón obstructivo. Sin embargo, se evidenció que la capacidad vital forzada (CVF) para el caso número tres, quien es ex-fumador se encontró por debajo de los parámetros normales, es decir, menor al 80 % (Tabla 6). El leve compromiso de volúmenes pulmonares puede deberse a que todos los sujetos evaluados tenían niveles de lesión que no comprometían la integridad diafragmática, su afección estaba ligada con musculatura accesoria de la respiración. Al respecto, investigaciones demuestran que sujetos con lesiones cervicales altas (C2-C5) pueden tener una capacidad vital forzada cercana al 50 % del valor predicho, en cambio, los sujetos con lesiones torácicas y lumbares pueden alcanzar valores del predicho mayores al 60 % aumentando 1 % por cada nivel de lesión (Gomez Garrido, 2014).

Por último, en la movilidad torácica, se evidenció que el caso número uno, quien llevaba un año practicando paranatación y nunca había fumado, obtuvo valores más altos en la cirtometría a nivel axilar y xifoidea; esto en comparación con el caso número dos quien llevaba el mismo tiempo practicando para-natación, pero era fumador activo al momento de la evaluación y los casos que llevaban tres meses en la práctica del deporte (Tabla 7). En ese orden de ideas, es probable que la práctica deportiva en este medio les permita conservar la función pulmonar. Lo anterior debido a que se ha demostrado que la inmersión en agua aumenta la fuerza muscular y mejora la mecánica respiratoria. Pese que en la revisión de la literatura científica no se encontraron estudios del impacto del agua en la movilidad torácica de paranadores vale la pena mencionar que investigaciones las cuales destacan que el entrenamiento físico en medio acuático en adultos mayores es el más recomendado ya que existe un mayor aumento en la movilidad torácica axilar-xifoidea comparado con el medio terrestre. De esta manera, la natación se convierte en una estrategia eficaz para conservar la función respiratoria en sujetos con lesiones en la médula espinal, que como se sabe, está comprometida (Cardona García *et al*., 2016).

Tabla 5. Características relacionadas con la independencia funcional de los casos a estudio.
Table 5. Characteristics related to the functional independence of study cases.

		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Independencia funcional					
Cuidador en casa		No	Si	Si	Si
Parentesco del cuidador		No aplica	Mamá	Sobrina	Prima
Índice de Barthel	Alimentación	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)
	Baño	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)
	Vestirse	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)
	Aseo personal	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)	Independiente (5/5)
	Deposición	Continente (10/10)	Continente (10/10)	Continente (10/10)	Continente (10/10)
	Micción	Continente (10/10)	Continente (10/10)	Ocasional (5/10)	Continente (10/10)
	Manejo inodoro	Independiente (10/10)	Independiente (10/10)	Ayuda (5/10)	Ayuda (5/10)
	Desplazamiento silla/ cama	Independiente (15/15)	Independiente (15/15)	Independiente (15/15)	Independiente (15/15)
	Deambular	Independiente silla de ruedas (5/15)	Independiente silla de ruedas (5/15)	Independiente silla de ruedas (5/15)	Independiente silla de ruedas (5/15)
	Subir escaleras	Dependiente (0/10)	Dependiente (0/10)	Dependiente (0/10)	Dependiente (0/10)
	Interpretación (puntuación)	80 ptos	80 ptos	70 ptos	75 ptos
	Grado de dependencia	Dependencia leve	Dependencia leve	Dependencia leve	Dependencia leve

Tabla 6. Características espirométricas de los casos a estudio.
Table 6. Spirometric characteristics of study cases.

	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Características espirométricas				
CVF en % del predicho	90	87	74	90
VEF1 en % del predicho	94	95	79	97
Relación VEF1/CVF en %	83	91	86	93

Tabla 7. Movilidad torácica de los casos a estudio.
Table 7. Thoracic mobility of study cases.

			CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Movilidad torácica						
Cirtometría Axilar (cm)	*Mejor toma*	*Max. insp*	109	102.3	100,5	98
		Max. Esp	103.4	98.7	97.5	96.5
		Diferencia	5.6	3.6	3	1.5
Cirtometría Xifoidea (cm)	*Mejor toma*	*Max. insp*	102.7	95.8	96	103
		Max. Esp	100.2	93.5	94.5	101
		Diferencia	2.5	2.3	1.5	2

Para finalizar, es importante reconocer que los estudios alrededor de la temática del deporte paralimpico se ven limitados por el reducido número de para-atletas que participan de esta modalidad deportiva en especial en países que están incursionando en el alto rendimiento del movimiento paralimpico.

CONCLUSIONES

Los paranadores estudiados no tuvieron alteraciones en la función pulmonar medida con la espirometría simple. Es probable que los deportistas con historial tabáquico y nivel de lesión más alto presentan disminución en la movilidad torácica. Además que el entrenamiento en medio acuático puede producir beneficios en la movilidad torácica en los lesionados medulares. Todos los sujetos tuvieron dependencia funcional leve, probablemente a su práctica deportiva.

AGRADECIMIENTOS

Se hace reconocimiento especial a los deportistas por la disposición y el interes a participar en actividades de investigación de esta indole las cuales favorecen la evolución del area esto de la mano de los entrenadores.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Ninguno

REFERENCIAS

Brizuela Costa, G., Romero Ávila J.L. y Beltrán Herranz, J. 2016. Lesión medular y ejercicio físico: revisión desde una perspectiva deportiva. Revista Española de Discapacidad 4 (2): 163-185.

Cardona García, N., Granada Ramirez, J.C., Tapasco Ypia, M.A. y Tonguino Rosero, S. 2016. Efecto de un programa de ejercicios respiratorios y aeróbicos en medio acuático versus terrestre para adultos mayores. Rev Univ Ind Santander Salud. 48(4): 516-525.

Gomez Garrido, A. 2014. Lesión medular y repercusión en el sistema respiratorio. Ph. D. cirugía. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.

Grupo Vigilancia en Salud Pública. 2023. Análisis de situación de salud del Valle del Cauca 2022. Valle del Cauca.

Muñoz Jiménez, E.M., Garrote Rojas, D. y Sánchez Romero, C. 2017. La práctica deportiva en personas con discapacidad: motivación personal, inclusión y salud. International Journal of Developmental and Educational Psychology. Vol 4, núm. 1, pp. 145-152.

Reina, R., Vivaracho, I., García Alaguero J.L. y Roldán A. 2021. Guía sobre la clasificación en el deporte paralímpico. Ed Limencop S.L. España.

Ternovoy, K.S., Romanchuk, A.P., Sorokin, M.Yu. y Pankova, N.B. 2012. Characteristics of the functioning of the cardio-respiratory system and autonomic regulation in para-athletes with spinal injury. Human Physiology. Vol. 38, No. 4, pp.83-88.

Bockenhauer, S.E., Chen, Haifan., Julliard, K.N. y Weedon, J. 2007. Measuring thoracic excursion: Reliability of the cloth tape measure technique. Journal of Osteopathic Medicine Journal of Osteopathic Medicine.107:191-196.

Pulgar Muñoz, S., y Fernández Luna, A. 2019. Práctica de actividad física, consumo de tabaco y alcohol y sus efectos en la salud respiratoria de los jóvenes universitarios. Retos. 35: 130-135.

Lazovic Popovic, B., Zlatkovic Svenda, M., Durmic, T., Djelic, M., Djordjevic Saranovic, S. y Zugic, V. 2016. Superior lung capacity in swimmers: Some questions, more answers!. Rev Port Pneumol. 22(3):151-6.

Velasco Vanegas, D.A. 2019. El deporte como resiliencia en personas con diversidad funcional motora adquirida. Trabajo de grado Psicología .Universidad de San Buenaventura. Cali.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Evidence of morphological variation in an isolated refuge population of the Sonoyta pupfish (*Cyprinodon eremus*) (Teleostei: Cyprinodontidae)

Evidencia de variación morfológica en una población de refugio aislada del cachorrito de Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) (Teleostei: Cyprinodontidae)

Alexsandre Gutiérrez-Barragán[1], Carlos A. Ballesteros-Córdova[2*], Alejandro Varela-Romero[3*], Gorgonio Ruiz-Campos[4], José M. Grijalva-Chon[3]

[1] Licenciatura en Biología. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
[2] Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora (DAGUS), Hermosillo, Sonora, México.
[3] Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Hermosillo Sonora, México.
[4] Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California, México.

ABSTRACT

The Sonoyta pupfish (*Cyprinodon eremus*) is an endangered species endemic to the Sonoyta River basin, in northwestern México and southwestern United States. To assist the conservation efforts for this species in México, a refuge population was established in an artificial pond in 1988 at Centro Ecológico de Sonora in Hermosillo, Sonora by translocating individuals from the Sonoyta River population. We used multivariate morphometric methods to delineate body shape variations in the refuge population after 29 years of isolation, in comparison with wild individuals collected from the same sample. Significant variations were observed in body shape between refuge and wild populations. These variations are potentially attributable to different environmental conditions that influenced the refuge and wild populations.

Keywords: Conservation, recovery, morphological change, multivariate morphometrics.

RESUMEN

El pez cachorrito de Sonoyta (*Cyprinodon eremus*) es una especie en peligro de extinción endémica de la cuenca del Río Sonoyta en el noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos. Para ayudar en los esfuerzos de conservación de esta especie en México, se estableció una población de refugio en un estanque artificial en 1988 en el Centro Ecológico de Sonora en Hermosillo, Sonora mediante la translocación de individuos de la población del Río Sonoyta. Usamos métodos morfométricos multivariados para delinear las variaciones en la forma del cuerpo en la población del refugio después de 29 años de aislamiento en comparación con individuos silvestres recolectados de la misma muestra. Se observaron variaciones significativas en la forma del cuerpo entre las poblaciones del refugio y las silvestres. Estas variaciones son potencialmente atribuibles a diferentes condiciones ambientales que influyeron en las poblaciones silvestres y del refugio.

Palabras clave: Conservación, recuperación, cambio morfológico, morfometría multivariada.

INTRODUCTION

The Sonoyta pupfish (*Cyprinodon eremus*) (Miller and Fuiman, 1987) is distributed in the Sonoyta River basin and the Quitobaquito Springs in northwestern México and the southwestern United States of America (USA) (Echelle *et al*., 2000; Miller *et al*., 2009; Minckley and Marsh, 2009). The Quitobaquito Springs population is stable, however, the Sonoyta River population is decreasing. These declines are the result of exotic fish introductions, drought, and groundwater pumping that dramatically affects native aquatic habitats (Miller and Fuiman, 1987; Miller *et al*., 2009; Minckley and Marsh, 2009). Currently, this trend of degradation and desiccation continues in the Sonoyta River promoted by the need for water for human growth (Miller *et al*., 2009; Minckley and Marsh, 2009; Minckley *et al*., 2013). The only perennial water flow in the river that persists, is about 1 km in length at the Agua Dulce or Papalote locality (USON 0222, Table 1), and is maintained during the dry season by underground flow of shallow waters (Minckley *et al*., 2013).

C. eremus is considered as endangered by the International Union for Conservation of Nature and the United States government (NatureServe *et al*., 2019). Strategies to manage *Cyprinodon* spp. include protecting their habitat and developing refuge populations to increase or re-establish wild populations in cases of extirpation (Minckley *et al*., 1991; Minckley, 1995; Koike *et al*., 2008). Refuges for *C. eremus* have been established in México to hamper the species' gradual extinction (Minckley *et al*., 2013). These conservation efforts also echo an initiative that sought to recover native fish in the arid southwest during the 1960s (Minckley, 1995). In 1988, the first refuge population was created from the Sonoyta River populations in an artificial pond with only lentic habitat located at Centro Ecológico de Sonora (CES) in Hermosillo, Sonora (Marsh and Sada, 1993). Between 2007 and 2011, another five refuges were established: one in the Biological Station and another in Schuk Toak Visitor Center (translocated to the Biological Station refuge), both of them at El Pinacate y Gran Desierto de Altar Biosphere Reserve (RBEPGDA), one at Centro Intercultural de Estudios de Desiertos y Océanos

*Authors for correspondence: Carlos A. Ballesteros-Córdova, Alejandro Varela Romero
e-mail: carlos.ballesteros@unison.mx, alejandro.varela@unison.mx
Received: october 20, 2023
Accepted: february 19, 2023
Published: march 4, 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2183

Table 1. Collecting sites for specimens from wild *Cyprinodon eremus* populations used in this study for morphometric and meristic analyses. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo, M = Males, F = Females.
Tabla 1. Sitios de recolección de especímenes de poblaciones silvestres de *Cyprinodon eremus* utilizados en este estudio para análisis morfométricos y merísticos. USON = Universidad de Sonora, Hermosillo, M = Machos, F = Hembras.

Species	Locality	Catalog number	Collection date (dd/mm/yy)	Geographic coordinates	Specimens analyzed	
					M	F
C. eremus	Sonora, Sonoyta River Basin, Ejido Josefa Ortíz de Domínguez, at Sonoyta-San Luis Río Colorado highway (km 11).	USON-0148	01 09 1987	31°54'N 112°58'W	17	14
C. eremus	Sonora, Río Sonoyta Basin, El Papalote, around 2 km southwest of Quitobaquito on the Sonoyta River, km 20 of the Sonoyta-San Luis Río Colorado highway.	USON-0222	07 09 1987	31°56'N 113°02'W	10	13
C. eremus	Sonora, Sonoyta River Basin, around 5 km south of the Sonoyta-San Luis Río Colorado highway (km 28).	USON-0225	07 09 1987	31°55.980'N 113°1.980'W	3	3
C. eremus	Sonora, Hermosillo city, Centro Ecológico de Sonora, in an artificial pond,	USON-1386	10 11 2017	29°0.794'N 110°57.059'W	30	30

(CEDO), one at Colegio de Bachilleres in Sonoyta (COBACH), and another at Quitovac that include fish stocked in the springs (Minckley *et al*., 2013). Currently, only the refuges at the RBEPGDA, COBACH, CEDO, and CES remain. The refuge in CES is the most populated (>1000 fish) for *C. eremus* in México. All the refuges were founded in México without an evaluation of their genetic variability.

Previously published papers on the pupfish family (Cyprinodontidae) have reported that populations with 15–30 years of isolation in distinct habitats develop morphological and genetic variations in the translocated populations (Collyer *et al*., 2005; Wilcox and Martin, 2006; Collyer *et al*., 2007; Koike *et al*., 2008; Lema, 2008; Collyer *et al*., 2011; Finger *et al*., 2013; Collyer *et al*., 2015; Black *et al*., 2017). These morphological changes may be attributed to phenotypic plasticity in response to alterations in the environmental conditions of the new habitats (Collyer *et al*., 2005; Wilcox and Martin, 2006; Collyer *et al*., 2007; Lema 2008; Collyer *et al*., 2015; Black *et al*., 2017), including evolutionary processes that occur on an ecological time scale (Collyer *et al*., 2007; Collyer *et al*., 2011). Translocating individuals to be used as reproductive stocks poses a risk for species management due to phenotypic differentiation (Collyer *et al*., 2005; Wilcox and Martin, 2006; Collyer *et al*., 2007; Lema, 2008; Collyer *et al*., 2011) and genetic adaptation to captivity (Frankham, 2008), potentially reducing the survivability of the captive population during reintroduction in a wild environment.

Considering that the Sonoyta pupfish population of the Sonoyta River has decreased drastically and the habitat historical water flow does not exist, the CES refuge population represents an opportunity for the recovery of the species. However, it has been isolated since 1988 in an artificial pond under distinct environmental conditions compared with the wild populations. In this regard, we performed multivariate morphometric analysis (Blackith and Reyment, 1971; Reyment, 1982) to characterize the morphological discrepancies between Sonoyta River wild *C. eremus* populations and CES refuge collected and founded from the same sample, respectively, with the goal of evidence the morphological variation after 29 years of isolation. The results obtained will help in redesigning, increasing the shelter area, and creating future management plans for species conservation.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Samples of the wild *Cyprinodon eremus* were collected from the Sonoyta River in 1987 using different seines. A subsample was fixed in 10 % formaldehyde and preserved in 50 % ethanol for final deposition in the native fish collection of the Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Another subsample from the wild fish collected in 1987 was kept alive and transported to CES facilities to establish the refuge population in 1988. All subsequent analyses herein were performed with the vouchers of the original collection and the offspring of the founding subsample.

We performed comparative morphometric analysis with 60 adult specimens (30 females and 30 males) of the wild *C. eremus* collected in 1987, as well as 60 adult specimens (30 females and 30 males) from the CES refuge population collected in 2017 using G-Minnow Traps (Table 1).

Morphometric analysis

Based on Hubbs and Lagler (2004) and the box-truss protocol (Strauss and Bookstein, 1982; Bookstein *et al.,* 1985; Table 2; Figure 1), 35 morphological distances were measured considering that these characters underwent variation in both sexes of the genus *Cyprinodon*, as a result of the distinct habitats (Humphries *et al.,* 1981; Collyer *et al.,* 2005; 2015; Black *et al.,* 2017). Seven meristic characters were also counted (Table 2) based on the description of *C. eremus* by Miller and Fuiman (1987). Females and males were separately analyzed due to

Table 2. Morphological distances modified from Humphries *et al.* (1981), Miller and Fuiman (1987), Hubbs and Lagler (2004), Collyer *et al*. (2005), Collyer *et al.* (2015), Black *et al.* (2017), and additional measures based on the box truss protocol (Strauss and Bookstein, 1982; Bookstein *et al*., 1985) and quantified meristic characters for *Cyprinodon eremus* based on Miller and Fuiman (1987).
Tabla 2. Distancias morfológicas modificadas de Humphries *et al*. (1981), Miller y Fuiman (1987), Hubbs y Lagler (2004), Collyer *et al*. (2005), Collyer *et al.* (2015), Black *et al.* (2017) y medidas adicionales basadas en el protocolo box truss (Strauss y Bookstein, 1982; Bookstein *et al*., 1985) y caracteres merísticos cuantificados para *Cyprinodon eremus* basados en Miller y Fuiman (1987).

Code	Morphometric character
M1-3	Dorsal length of head
M1-23	Upper lip - Center of the eye
M1-17	Head length
M1-12	Preanal length
M1-14	Prepelvic length
M1-16	Ventral length of head
M1-4	Length of upper jaw
M2-23	Lower lip - Center of the eye
M2-10	Standard length
M3-5	Occiput - Dorsal fin origin
M3-14	Occiput - Pelvic fin origin
M3-16	Occiput - Isthmus
M5-7	Length of depressed dorsal fin
M5-6	Length of dorsal fin base
M5-11	Dorsal fin origin - Base of the last anal fin ray
M5-14	Body depth
M5-16	Dorsal fin origin - Isthmus
M6-8	Dorsal length of caudal peduncle
M6-9	Base of the last dorsal fin ray – Ventral base of the caudal fin
M6-11	Anterior depth of caudal peduncle
M6-14	Base of the last dorsal fin ray - Pelvic fin origin
M8-9	Depth of caudal peduncle
M8-11	Dorsal base of the caudal fin - Base of the last anal fin ray
M9-11	Ventral length of caudal peduncle
M11-14	Base of the last anal fin ray – Pelvic fin origin
M12-13	Length of depressed anal fin
M14-15	Length of pelvic fin
M14-16	Pelvic fin origin - Isthmus
M18-19	Length of pectoral fin
M18-20	Length of pectoral fin base
M21-22	Eye diameter
A1	Interorbital width
A2	Head width
A3	Width of gape
A4	Body width
No.	**Meristic character**
1	Dorsal fin rays
2	Anal fin rays
3	Pectoral fin rays
4	Pelvic fin rays
5	Caudal fin rays
6	Scales from the dorsal fin origin to anal fin origin
7	Caudal peduncle scale count

the sexual dimorphism of cyprinodontids. Each specimen was examined with a digital caliper (precision 0.01 mm) connected to a personal computer.

The regression described by Elliot *et al.* (1995) was performed to standardize the body measurements of each specimen. This regression model removes the component of size from the shape measurements (allometry), thereby homogenizing their variances (Jolicoeur, 1963). Each character was standardized using the equation $Ms = Mo\ (Ls/Lt)^b$, where Ms = standardized measurement of the character; Mo = original measurement of the character (mm); Ls = average standard length (mm) of all the specimens from all the examined taxa; Lt = standard length (mm) of the specimen; and, "b" was estimated for each character from the observed data via the nonlinear regression equation $M = aL^b$. The parameter "b" was estimated as the slope of the regression log Mo on log Lt, using data from all specimens. The parameter "a" is the non-standardized measurement of the character (mm) and L = Ls/Lt.

The standardized morphometric data and meristic values of all the specimens were used to perform discriminant function analysis (DFA) and principal component analysis (PCA), which are the most used analyzes in multivariate morphometrics (Humphries *et al*., 1981; Reyment, 1982; Turan, 1999). In the case of the PCA it does not require an *a priori* assignment of individuals into groups, but rather summarizes in linear combinations, called Principal Components, the variables that describe the shape variation in the combined sample (Humphries *et al*., 1981; Turan, 1999). On the DFA, the individuals are assigned *a priori* into groups to calculate the function that better discriminates between the groups (Humphries *et al*., 1981; Turan, 1999). The DFA was performed independently for females and males via a forward stepwise form using Statistica 5.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa). It was performed to determine the combination of variables that optimally discriminated between wild and refuge populations. Statistically significant differences between populations were determined using Wilks' lambda (λ), which oscillates from 0.0 (perfect discrimination power) to 1.0 (absence of discrimination). Values with $p < 0.05$ obtained in the DFA were considered statistically significant. The PCA was performed using the "factoextra" (Kassambara and Mundt, 2020) and "FactoMineR" (Lê *et al*., 2008) R packages (R Core Team, 2021) to determine which morphological variables best explained the variability in the dataset.

The most important morphological characters selected by DFA and PCA were illustrated by violin and box plots. A one-way analysis of variance with a 95 % confidence interval was performed for each character to evaluate the null hypothesis of equality between the populations. After the null hypothesis was rejected, a post-hoc Tukey test was performed on Statistica 5.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa) to verify whether the groups significantly differed (Turan, 1999).

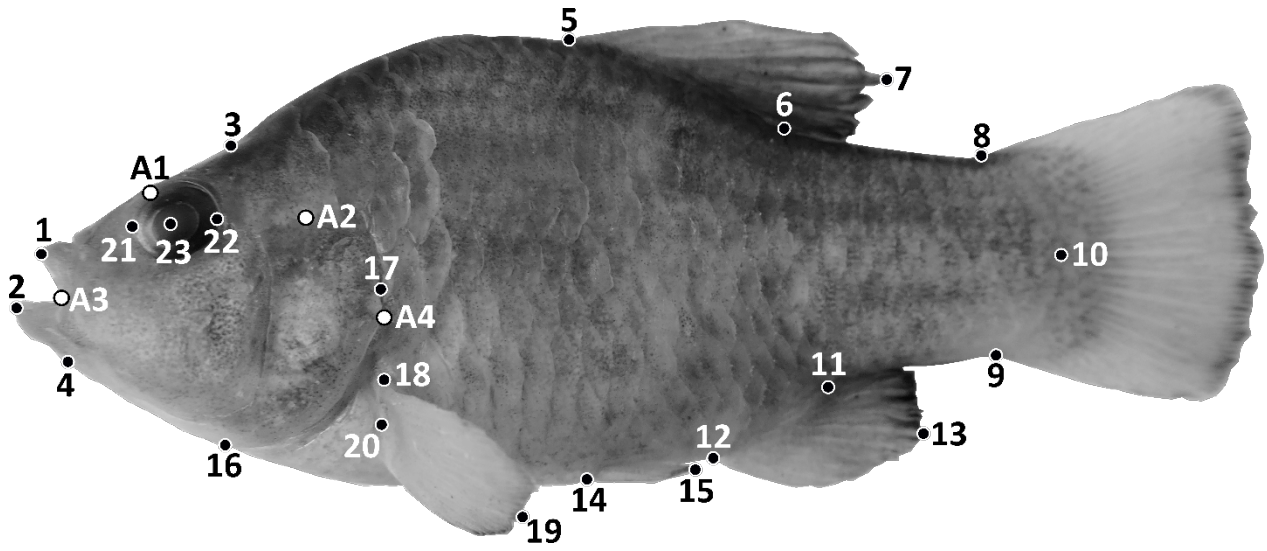


Fig. 1. Landmarks for Box Truss protocol used in *Cyprinodon eremus* analysis. Black dots represent landmarks for distance measurements and the white dots represent the reference marks for the width measurements (Table 2 contains explanation of measurement codes).
Fig. 1. Marcas para el protocolo Box Truss utilizado en el análisis de *Cyprinodon eremus*. Los puntos negros representan puntos de referencia para las medidas de distancia y los puntos blancos representan las marcas de referencia para las medidas de ancho (Tabla 2 contiene explicación de los códigos de medición).

RESULTS

DFA was performed on 120 specimens of *C. eremus*, females and males, from wild and refuge populations. 17 of the 41 morphological and meristic characters among females significantly distinguished the two populations (Table 3). The overall Wilks' lambda (λ) was 0.06404 ($p < 0.0001$), indicating a high degree of discrimination between the two female populations. A significant difference was observed for eight variables (Table 3). According to PCA for wild and refuge females, principal components 1 and 2 combined explained 38.656% of the total variance, the PC1 and PC2 explained 25.329 % and 13.327 %, respectively (Supplementary Table 1).

The scatterplot shows segregation between wild and refuge females, mostly along PC1 (Figure 2A). The variables that most contributed to PC1 were body depth, base of the last dorsal fin ray to pelvic fin origin, dorsal fin origin to base of the last anal fin ray, dorsal fin origin to isthmus, body width, anterior depth of caudal peduncle, depth of caudal peduncle, and occiput to pelvic fin origin, among others (Figure 2B; Supplementary Table 2). Of these, only body depth was selected by the DFA, and it was slightly non-significant ($p = 0.0565$, Table 3). In addition, the DFA selected the length of dorsal fin base, occiput to isthmus, length of pectoral fin base, length of the upper jaw, and width of gape to significantly ($p < 0.05$) discriminate between groups (Table 3); these variables also contributed to PC1 in the PCA (Figure 2B; Supplementary Table 2). Conversely, head width, caudal fin rays, and pectoral fin rays were significant ($p < 0.05$) in the discriminant function (Table 3) but contributed least to PC1 in the PCA (Supplementary Table 2).

The DFA selected 25 morphological and meristic variables that best discriminated the two male populations (Table 4). As observed in females, a high degree of discrimination between both populations was observed based on the Wilks' lambda ($\lambda = 0.08582$, $p < 0.0001$). Significant differences were observed in 13 variables ($p < 0.05$) (Table 4). The first two PCs in the PCA explained 31.87 % of the male variability, where PC1 explained 19.46 % and PC2 12.41% of the variance (Supplementary Table 3). The variables that contributed more to the PC1 were body depth, dorsal fin origin to the base of the last anal fin ray, occiput to isthmus, head length, depth of caudal peduncle, dorsal length of head, and occiput to pelvic fin origin (Figure 3B; Supplementary Table 4). However, the two *C. eremus* male populations were mostly differentiated along PC2 (Figure 3A), where the variables that most contributed to this PC were head width, the width of gape, lower lip to the center of the eye, base of the last dorsal fin ray to pelvic fin origin, base of the last anal fin ray to pelvic fin origin, eye diameter, length of upper jaw, preanal length, and anterior depth of caudal peduncle, among others (Figure 3B; Supplementary Table 4). Of these variables, the head width, base of the last dorsal fin ray to pelvic fin origin, lower lip to center of the eye, length of upper jaw and anterior depth of caudal peduncle were also significant ($p < 0.05$) in the DFA.

Other key variables in both the DFA ($p < 0.05$) and PC2 of the PCA were ventral length of head, head length, length of depressed dorsal fin and length of depressed anal fin (Table 4; Supplementary Table 4). However, the body depth, base of the last dorsal fin ray to ventral base of the caudal fin, scales from the dorsal fin origin to anal fin origin, and dorsal fin rays were important in the DFA ($p < 0.05$) (Table 4) but contributed less to PC2 of the PCA (Supplementary Table 4).

Finally, the most significant morphometric variables in the DFA that contributed most to the PCA in both female and male populations, were plotted using violin and box plots (Figure 4). There were 19 divergent morphometric characters between wild and refuge *C. eremus* populations. Both sexes

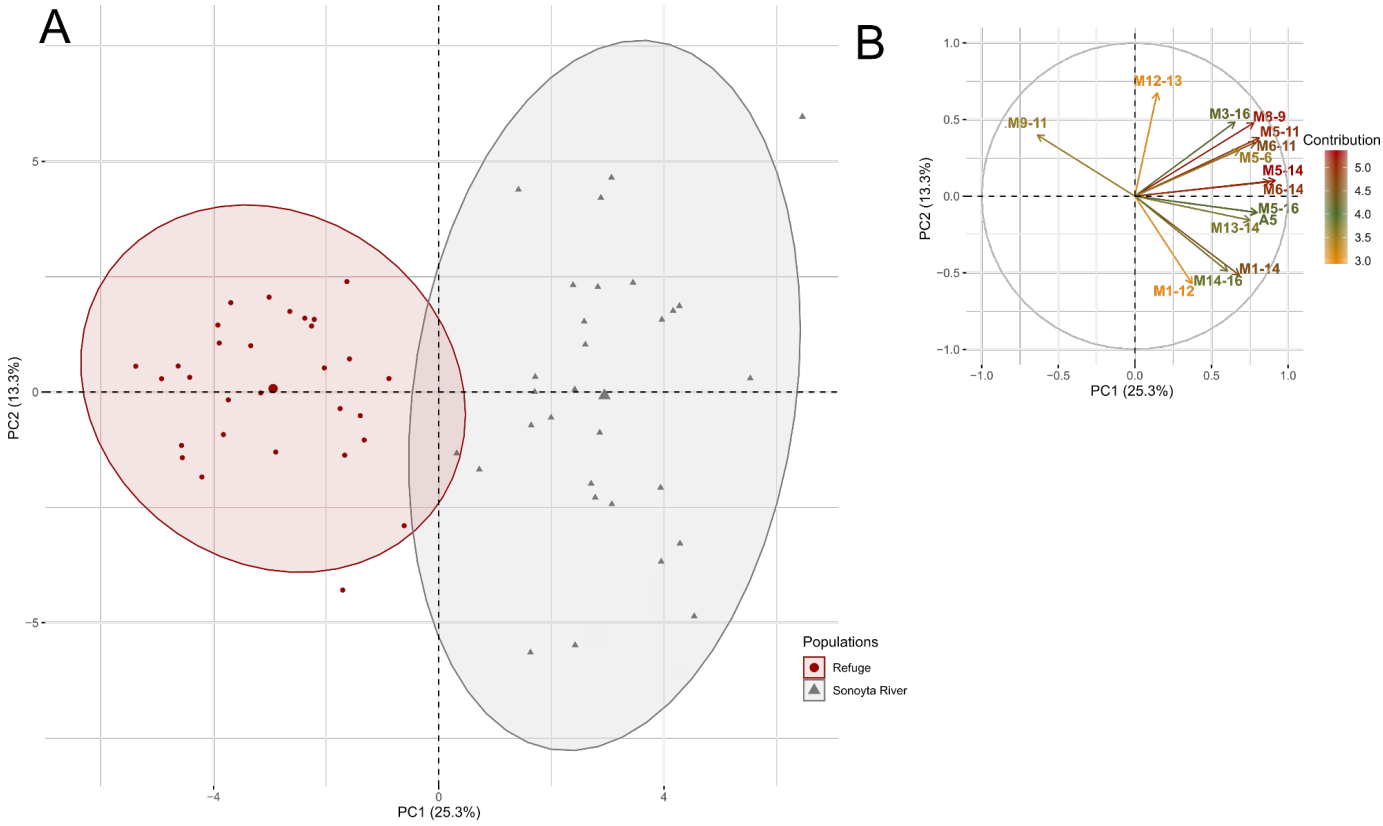


Fig. 2. PCA for the two *C. eremus* females' populations: (A) Scatterplots showing the position of the females along the first two PCs, the ellipses represent the 0.95 confidence intervals; (B) the correlation circle of the 15 variables that most contribute to these PCs (See supplementary table 2 for more information about the contribution of the variables).

Fig. 2. ACP para las dos poblaciones de hembras de *C. eremus*: (A) Gráfico de dispersión mostrando la posición de las hembras en los dos primeros CPs, las elipses representan los intervalos de confianza de 0.95; (B) círculo de correlación de las 15 variables que más contribuyen a estos CPs (Ver tabla suplementaria 2 para más información acerca de la contribución de las variables).

Table 3. Discriminant function analysis summary and the standardized coefficients in the discriminant function for the two *C. eremus* females' populations analyzed. Wilks' lambda values, significance (*p*) and tolerance for 17 variables selected by forward stepwise discriminant function analysis. Wilks' lambda: 0.06404 ($p < 0.0001$). Significant variables ($p < 0.05$) are indicated in bold.

Resumen del análisis de función discriminante y los coeficientes estandarizados en la función discriminante para las dos poblaciones de hembras de *C. eremus* analizadas. Valores lambda de Wilks, significancia (*p*) y tolerancia para 17 variables seleccionadas mediante análisis de función discriminante paso a paso hacia adelante. Lambda de Wilks: 0.06404 ($p < 0.0001$). Las variables significativas ($p < 0.05$) se indican en negrita.

Character	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (1,42)	p-value	Tolerance	Coefficient
Body depth	0.0699	0.9161	3.8471	0.0565	0.6126	0.3825
Length of upper jaw	**0.0878**	**0.7290**	**15.6142**	**0.0003**	**0.6940**	**-0.6459**
Length of dorsal fin base	**0.0816**	**0.7844**	**11.5455**	**0.0015**	**0.4781**	**0.6942**
Occiput – Dorsal fin origin	0.0680	0.9420	2.5844	0.1154	0.6579	0.3068
Caudal fin rays	**0.0857**	**0.7474**	**14.1921**	**0.0005**	**0.6103**	**0.6649**
Length of pectoral fin base	**0.0777**	**0.8245**	**8.9375**	**0.0047**	**0.5543**	**0.5815**
Head width	**0.0896**	**0.7145**	**16.7814**	**0.0002**	**0.5088**	**-0.7742**
Occiput – Isthmus	**0.0708**	**0.9051**	**4.4027**	**0.0419**	**0.4871**	**0.4562**
Pectoral fin rays	**0.0786**	**0.8144**	**9.5727**	**0.0035**	**0.5427**	**-0.6045**
Pelvic fin rays	0.0668	0.9592	1.7884	0.1883	0.6991	0.2498
Scales from the dorsal fin origin to anal fin origin	0.0667	0.9595	1.7747	0.1900	0.8171	0.2302
Width of gape	**0.0703**	**0.9107**	**4.1191**	**0.0488**	**0.6585**	**0.3807**
Upper lip – Center of the eye	0.0687	0.9318	3.0719	0.0870	0.5238	-0.3729
Preanal length	0.0687	0.9324	3.0466	0.0882	0.5644	0.3578
Dorsal fin rays	0.0675	0.9489	2.2614	0.1401	0.6994	-0.2794
Head length	0.0673	0.9511	2.1603	0.1491	0.3735	0.3741
Dorsal length of head	0.0664	0.9650	1.5252	0.2237	0.3722	-0.3171

Table 4. Discriminant function analysis summary for males and the standardized coefficients in the discriminant function for the two *C. eremus* populations analyzed. Wilks' lambda values, significance (*p*) and tolerance for 18 variables selected by forward stepwise discriminant function analysis. Wilks' lambda: 0.08582 ($p < 0.0001$). Significant variables ($p < 0.05$) are indicated in bold.
Tabla 4. Resumen del análisis de función discriminante para los machos y los coeficientes estandarizados en la función discriminante para las dos poblaciones de *C. eremus* analizadas. Valores lambda de Wilks, significancia (*p*) y tolerancia para 35 variables seleccionadas mediante análisis de función discriminante paso a paso hacia adelante. Lambda de Wilks: 0.08582 ($p < 0.0001$). Las variables significativas ($p < 0.05$) se indican en negrita.

Character	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (1,34)	p-value	Tolerance	Coefficient
Anterior depth of caudal peduncle	**0.0984**	**0.8725**	**4.9683**	**0.0325**	**0.2455**	**-0.7537**
Head width	**0.0984**	**0.8725**	**4.9670**	**0.0326**	**0.3131**	**0.6673**
Length of depressed anal fin	**0.1392**	**0.6166**	**21.1438**	**0.0001**	**0.2658**	**-1.2562**
Scales from the dorsal fin origin – Anal fin origin	**0.0995**	**0.8621**	**5.4390**	**0.0258**	**0.5077**	**0.5451**
Occiput – Pelvic fin origin	0.0866	0.9906	0.3243	0.5728	0.2268	0.2135
Length of upper jaw	**0.1038**	**0.8269**	**7.1179**	**0.0116**	**0.3876**	**0.6990**
Base of the last dorsal fin ray – Ventral base of the caudal fin	**0.1567**	**0.5476**	**28.0904**	**0.0000**	**0.1339**	**1.9228**
Dorsal fin rays	**0.1030**	**0.8330**	**6.8176**	**0.0133**	**0.2861**	**0.7991**
Dorsal base of the caudal fin – Base of the last anal fin ray	0.0866	0.9911	0.3050	0.5844	0.2801	-0.1863
Ventral length of caudal peduncle	0.0902	0.9516	1.7302	0.1972	0.2896	-0.4277
Base of the last dorsal fin ray – Pelvic fin origin	**0.1094**	**0.7847**	**9.3293**	**0.0044**	**0.1794**	**1.1457**
Prepelvic length	0.0937	0.9158	3.1244	0.0861	0.3318	0.5268
Dorsal fin origin – Isthmus	0.0908	0.9447	1.9893	0.1675	0.3914	-0.3930
Lower lip – Center of the eye	**0.0976**	**0.8791**	**4.6758**	**0.0377**	**0.1683**	**-0.8864**
Caudal peduncle scale count	0.0928	0.9250	2.7582	0.1060	0.4560	-0.4243
Body depth	**0.1119**	**0.7666**	**10.3489**	**0.0028**	**0.0616**	**-2.0361**
Ventral length of head	**0.1171**	**0.7331**	**12.3770**	**0.0013**	**0.1500**	**1.3949**
Length of depressed dorsal fin	**0.1004**	**0.8551**	**5.7592**	**0.0220**	**0.1594**	**-0.9971**
Dorsal length of caudal peduncle	0.0904	0.9495	1.8066	0.1878	0.3103	-0.4217
Pectoral fin rays	0.0892	0.9616	1.3575	0.2521	0.5318	0.2810
Head length	**0.0969**	**0.8855**	**4.3955**	**0.0435**	**0.1488**	**0.9174**
Width of gape	0.0940	0.9128	3.2480	0.0804	0.1939	-0.7014
Base of the last anal fin ray – Pelvic fin origin	0.0889	0.9649	1.2364	0.2740	0.4171	-0.3033
Pelvic fin origin – Isthmus	0.0903	0.9507	1.7642	0.1929	0.3970	0.3687
Caudal fin rays	0.0892	0.9624	1.3279	0.2572	0.5229	-0.2804

of the refuge population exhibited a greater length of the upper jaw but a shorter body width, length of the depressed dorsal fin, dorsal fin origin to the base of the last anal fin ray, anterior depth of the caudal peduncle, dorsal fin origin to the isthmus, and base of the last dorsal fin ray to pelvic fin origin compared with the wild population (Figure 4 A-G).

The females of the refuge population had a reduced width of gape, lower lengths from the occiput to pelvic fin origin and from the occiput to the isthmus, lower depths of body and caudal peduncle, and shorter length of the dorsal and pectoral fin bases compared with those of the wild *C. eremus* population (Figure 4 H-N, respectively). Conversely, the males of the refuge population showed greater widths of the gape (Figure 4 H) and of the head, higher ventral length of head, and preanal length, but a shorter length from the base of the last anal fin ray to pelvic fin origin and shorter length of depressed anal fin compared with those of the wild *C. eremus* population (Figure 4 O-S).

DISCUSSION

The present study showed evidence of morphological variations in the refuge population of *C. eremus*, after 29 years of isolation in an artificial pond with a homogeneous environment distinct from its wild habitat. Upon comparing the CES refuge population with the wild population originally collected in a natural stream habitat from the Sonoyta River during the establishment of the refuge, we detected morphotypes associated with habitat type. Changes were observed in the mouth, head, body, and caudal peduncle regions. The refuge population had a longer upper jaw and

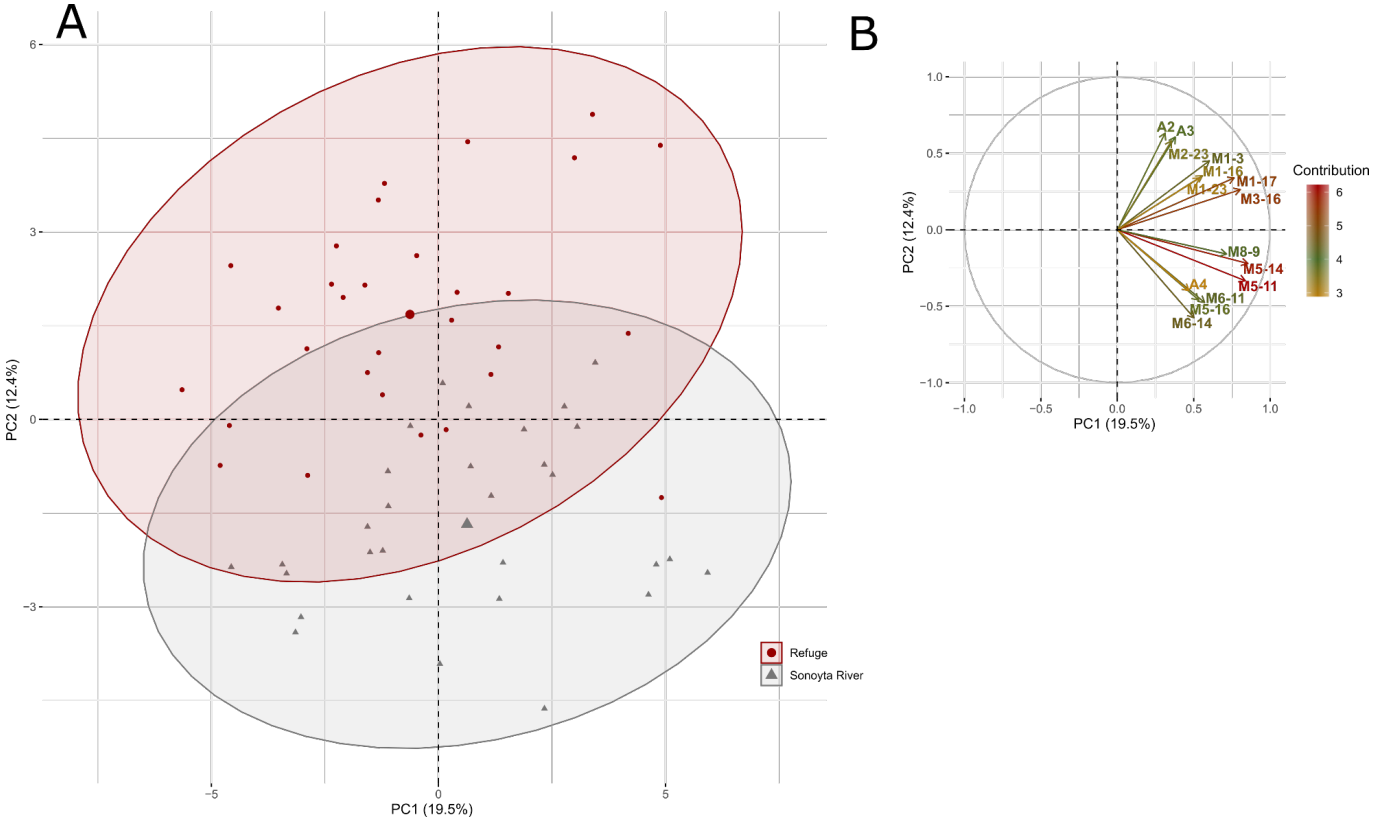


Fig. 3. PCA for the two *C. eremus* males' populations: (A) Scatterplots showing the position of the males along the first two PCs, the ellipses represent the 0.95 confidence intervals; (B) the correlation circle of the 15 variables that most contribute to these PCs (See supplementary table 4 for more information about the contribution of the variables).

Fig 3. ACP para las dos poblaciones de machos de *C. eremus*: (A) Gráfico de dispersión mostrando la posición de los machos en los dos primeros CPs, las elipses representan los intervalos de confianza de 0.95; (B) círculo de correlación de las 15 variables que más contribuyen a estos CPs (Ver tabla suplementaria 4 para más información acerca de la contribución de las variables).

varied width of gape. McGee *et al.* (2013) suggested that jaw traits affect feeding kinematics in fishes. Changes in head orientation and upward repositioning have been detected in Devil's Hole pupfish *Cyprinodon diabolis* (Wilcox and Martin, 2006) and *Cyprinodon bovinus* (Black *et al*., 2017), which may be related to foraging behavior (Black *et al*., 2017). Furthermore, changes in body depth and width were observed in the refuge *C. eremus* population. Similar variations observed in *Cyprinodon pecosensis* have been related to the size of their intestine due to the different types of food available in their habitat (Collyer *et al*., 2015). The distributions and types of food available in the water column likely differ between the wild and refuge habitats of *C. eremus*. Ultimately, these variables may contribute to morphological changes observed in the wild and refuge populations.

The refuge *C. eremus* males had wider heads. Previously, *C. pecosensis* found in lentic sinkhole populations exhibited longer heads, which was attributed to a larger gill size adapted to prevent hypoxia in a low dissolved oxygen environment (Collyer *et al*., 2015). Here, the *C. eremus* refuge population inhabits an artificial pond with limited water circulation and the presence of algae. These factors may contribute to a wider head, that allows more gill space, thereby reducing the risk of hypoxia when the dissolved oxygen levels in the refuge pond decrease.

Modifications in the pectoral fin attachment have been associated with enhanced maneuverability in the water column (Black *et al*., 2017). Moreover, the reduction in the length of the pectoral fin base in *C. eremus* refuge females, depressed dorsal fin in refuge individuals, depressed anal fin in refuge males, and base of the dorsal fin in refuge females may be associated with a lower requirement for stability in the artificial pond, an environment without running water. Also, the anterior depth of the caudal peduncle was lower in both females and males from the refuge population; in the refuge females, the length from the base of the last dorsal fin ray to pelvic fin origin, was shorter, and the depth of the caudal peduncle was lower accounting for slender caudal regions. Variations in the caudal region of *Cyprinodon* have been associated with water flow and the presence of predators (Tobler and Carson, 2010; Collyer *et al*., 2015). Thus, individuals from the refuge population, especially females, had slender caudal regions, potentially because they did not need to swim against the watercourse or move between habitats in the lentic pond environment.

Although morphological differences were observed between the wild and refuge *C. eremus* males, more disparities were observed between females between these populations. In *C. diabolis,* wild males have been shown to be more ag-

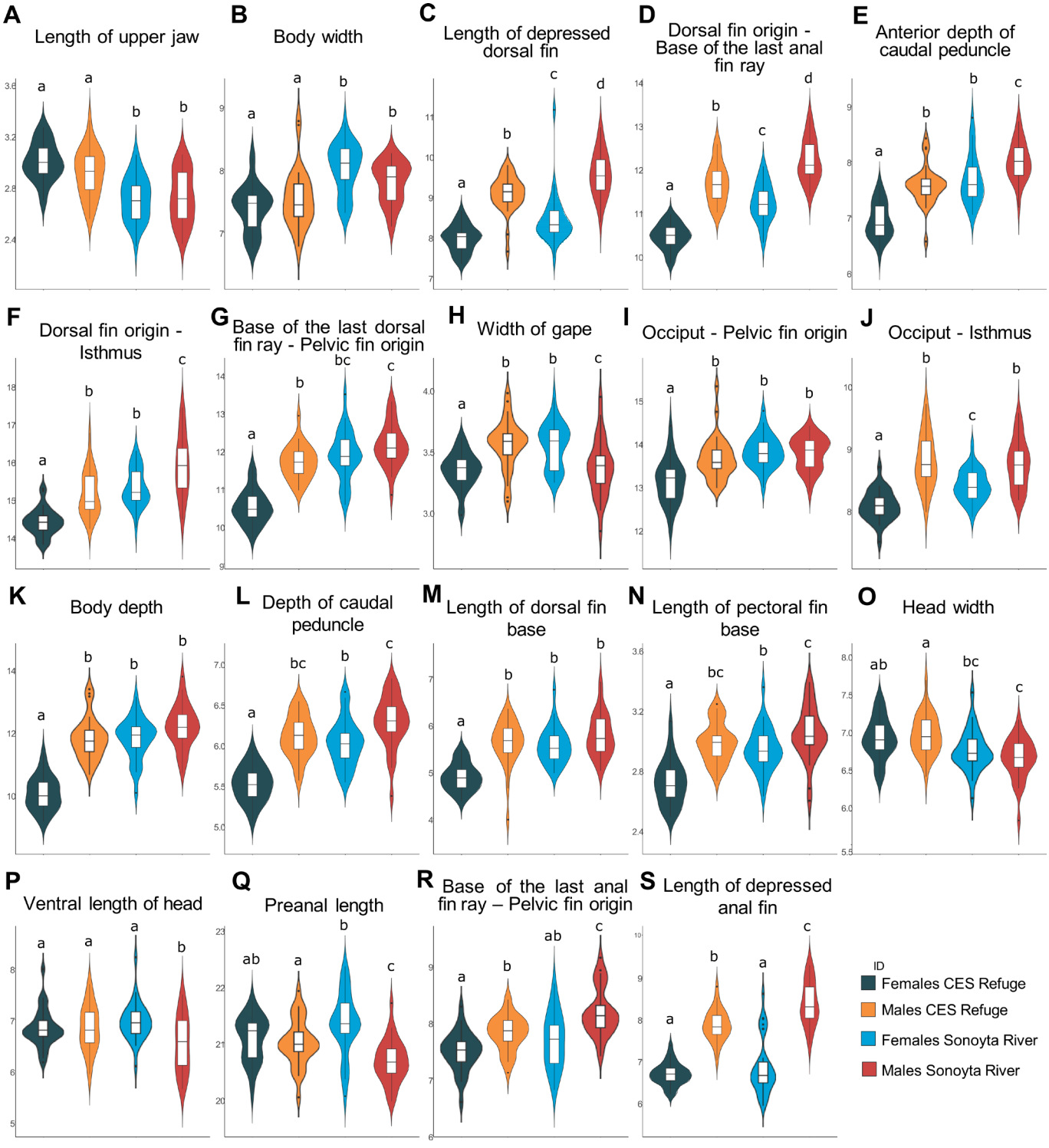


Fig 4. Violin and box plots of the most notable morphological characters for differentiating wild and refuge populations of Cyprinodon eremus. The letters above the bars represent the significant differences among groups according to the Tukey test ($p < 0.05$), and the Y-axis values are in millimeters.
Fig 4. Gráficos de violín y diagramas de cajas de los caracteres morfológicos más destacados para diferenciar poblaciones silvestres y de refugio de Cyprinodon eremus. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$) y los valores en el eje Y están dados en milímetros.

gressive than two populations stocked in two artificial ponds in defending their respective territories (Wilcox and Martin, 2006). Similarly, *C. eremus* males fight each other to protect their territory and reproduce with receptive females (Cox, 1966). Unlike in *C. diabolis* males, within the mechanisms operating in wild *C. eremus* males for intimidating opponents and courting females, the male body shape plays an essential role, which is retained in the refuge males. Refuge males that maintained a body shape similar to wild males likely exhibited better fitness if the selective pressures of the environment were not strong enough to determine survival. Similar results were found in *Cyprinodon tularosa*, wherein males showed a positive association between body depth and size, likely related to the territorial defense, and females showed a decreased association between body depth and size (Collyer *et al*., 2005). Therefore, the morphological variations in *C. eremus* females were more pronounced than in males, because morphological character selection in females may be regulated by environmental conditions and not by sexual selection.

Rodríguez-Ramírez *et al*. (2023) recently studied the genetic variability of the CES and other two refuge populations and wild *C. eremus* from the Sonoyta River using seven microsatellite loci. The CES population showed less genetic variability compared to the others. This lower genetic variation in CES refuge is more related to the time of isolation in contrast to the others analyzed (Rodríguez-Ramírez *et al*., 2023). As mentioned by Koike *et al*. (2008) and Finger *et al*. (2013), typical long established pupfish refuge populations showed low diversity and significant divergence in allele frequencies.

Notably, lower genetic variability may reduce the survivability of the CES refuge *C. eremus* population and its ability to reproduce in its native environmental, as observed for other *Cyprinodon* spp. (Wilcox and Martin, 2006; Collyer *et al*., 2011). This could hinder attempts to re-establish or increase native pupfish populations in the Sonoyta River, as has been the case for other Cyprinodontidae species (Hendrickson and Brooks, 1991; Black *et al*., 2017). Therefore, it is necessary to evaluate the phenotypic and genetic diversities of the remaining wild populations and the rest of the refuges, including CES, to detect isolation-induced morphological and genetic variations. Consequently, a management plan is necessary for the conservation of *C. eremus*, considering the information on morphology and genetic variation. Measures must be taken to avoid morphological changes by increasing the heterogeneity of artificial habitats conditions rendering them more similar to wild habitats conditions (Black *et al*., 2017). Wild individuals should also be translocated to the refuge population to increase genetic variability and therefore reduce the decline in fitness (Wilcox and Martin, 2006; Araki *et al*., 2007; Frankham, 2008; Black *et al*., 2017; Rodríguez-Ramírez *et al*., 2023). We recommend an extensive survey to obtain samples from all localities and habitat types of the entire *C. eremus* distribution to account for the phenotypic variability in each habitat.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Centro Ecológico de Sonora for specimens donation to conduct the analysis. To the Colección de Peces Nativos del Laboratorio de Vertebrados e Invertebrados of DICTUS for providing specimens of wild populations of the Sonoyta pupfish. CONAPESCA issuing the Permiso de Pesca de Fomento PPF/DGOPA-023/18 for the collection of specimens. We thanks to the two anonymous referees and the Associated Editor of the Journal for the comments and editions to improve the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Araki, H., Cooper, B., and Blouin, M.S. 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. Science: 318, 100-103, DOI: 10.1126/science.1145621.

Black, A., Seears, H., Hollenbeck, C., and Samollow, P. 2017. Rapid genetic and morphologic divergence between captive and wild populations of the endangered Leon Springs pupfish, *Cyprinodon bovinus*. Molecular Ecology: 26, 2237-2256, DOI: 10.1111/mec.14028.

Blackith, R.E., and Reyment, R.A. 1971. *Multivariate morphometrics*. Academic Press, London.

Bookstein, F.L., Chernoff, B., Elder, R.L., Humphries, J.L., Smith, G.R., and Strauss, R.F. 1985. Morphometrics in evolutionary biology: the geometry of size and shape change, with examples from fishes. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Ann Arbor.

Collyer, M.L., Hall, M.E., Smith, M.D., and Hoagstrom, C.W. 2015. Habitat-morphotype associations of Pecos Pupfish (*Cyprinodon pecosensis*) in isolated habitat complexes. Copeia. 103; 181-199, DOI: 10.1643/OT-14-084.

Collyer, M.L., Heilveil, J.S., and Stockwell, C.A. 2011. Contemporary evolutionary divergence for a protected species following assisted colonization. PLoS One 6(8), e22310, DOI: 10.1371/journal.pone.0022310

Collyer, M.L, Novak, J.M., and Stockwell, C.A. 2005. Morphological divergence of native and recently established populations of White Sands Pupfish (*Cyprinodon tularosa*). Copeia. 2005: 1-11, DOI: 10.1643/CG-03-303R1.

Collyer, M.L., Stockwell, C.A., Adams, D.C., and Reiser, M.H. 2007. Phenotypic plasticity and contemporary evolution in introduced populations: evidence from translocated populations of white sands pupfish (*Cyprinodon tularosa*). Ecological Research. 22: 902-910, DOI: 10.1007/s11284-007-0385-9.

Cox, T.J. 1966. A behavioral and ecological study of the desert pupfish (*Cyprinodon macularius*) in Quitobaquito Springs, Organ Pipe Cactus National Monument, Arizona. PhD thesis, University of Arizona.

Echelle, A.A., Van Den Bussche, R.A., Malloy, Jr T.P., Haynie, M.L., and Minckley, C.O. 2000. Mitochondrial DNA variation in pupfishes assigned to the species *Cyprinodon macularius* (Atherinomorpha:Cyprinodontidae):taxonomicimplications and conservation genetics. Copeia. 2000: 353-364, DOI: 10.1643/0045-8511(2000)000[0353:MDVIPA]2.0.CO;2.

Elliott, N.G., Haskard, K., and Koslow, J.A. 1995. Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) of the continental slope of southern Australia. Journal of Fish Biology. 46: 202-220, DOI: 10.1111/j.1095-8649.1995.tb05962.x.

Finger, A.J., Parmenter, S., and May, B.P. 2013. Conservation of the Owens pupfish: genetic effects of multiple translocations and extirpations. Transactions of the American Fisheries Society. 142: 1430-1443, DOI: 10.1080/00028487.2013.811097.

Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology 17: 325-333, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03399.x

Hendrickson, D.A., and Brooks, J.E. 1991. Transplanting short-lived fishes in North American deserts: review, assessment, and recommendations. In: Battle against extinction: native fish management in the American West. W.L. Minckley, J.E. Deacon (eds.), pp 283- 298. The University of Arizona Press, Tucson.

Hubbs, C.L., and Lagler, K.F. 2004. Fishes of the Great Lakes region. Revised Edition by Smith GR. University of Michigan Press, Ann Arbor.

Humphries, J.M., Bookstein, F.L., Chernoff, B., Smith, G.R., Elder, R.L., and Poss, S.G. 1981. Multivariate discrimination by shape in relation to size. Systematic Zoology. 30: 291-308, DOI: 10.1093/sysbio/30.3.291.

Jolicoeur, P. 1963. 193. Note: Multivariate generalization of the allometry equation. Biometrics. 19: 497-499, DOI: 10.2307/2527939.

Kassambara, A., and Mundt, F. 2020. Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. R Package Version 1.0.7. https://CRAN.R-project.org/package=factoextra [Accessed on 20 VIII 23].

Koike, H., Echelle, A.A., Loftis, D., and Van Den Bussche, R.A. 2008. Microsatellite DNA analysis of success in conserving genetic diversity after 33 years of refuge management for the desert pupfish complex. Animal Conservation. 11: 321-329, DOI: 10.1111/j.1469-1795.2008.00187.x.

Lê, S., Josse, J., and Husson, F. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. Journal of statistical software. 25: 1-18, DOI: 10.18637/jss.v025.i01.

Lema, S.C. 2008. The phenotypic plasticity of Death Valley's pupfish: Desert fish are revealing how the environment alters development to modify body shape and behavior. American Scientist. 96: 28-36, www.jstor.org/stable/27859085.

Marsh, P.C., and Sada, D.W.1993. *Desert Pupfish recovery plan*. U.S. Fish and Wildlife Service, Phoenix.

McGee, M.D., Schluter, D., and Wainwright, P.C. 2013. Functional basis of ecological divergence in sympatric stickleback. BMC Evolutionary Biology. 13: 277, DOI: 10.1186/1471-2148-13-277.

Miller, R.R., and Fuiman, L.A. 1987. Description and conservation status of *Cyprinodon macularius eremus*, a new subspecies of pupfish from Organ Pipe Cactus National Monument, Arizona. Copeia. 1987(3): 593-609, DOI: 10.2307/1445652.

Miller, R.R., Minckley, W.L., and Norris, S.M. 2009. Peces dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Minckley, C., Pompa, I.I., Duncan, D., Timmons, R., Caldwell, D., Méndez, J.L., and Rosen, P. 2013. Native aquatic vertebrates: Conservation and management in the Río Sonoyta basin, Sonora, Mexico. In: Merging science and management in a rapidly changing world: Biodiversity and management of the Madrean Archipelago III: 67. G.J. Gottfried, P.F. Folliott, B.S. Gebow, L.G. Eskew, L.C. Collins (eds.), U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS. Fort Collins, CO: U.S. P.

Minckley, W.L. 1995. Translocation as a tool for conserving imperiled fishes: Experiences in western United States. Biological Conservation. 72: 297-309, DOI: 10.1016/0006-3207(94)00091-4

Minckley, W.L., and Marsh, P.C. 2009. Inland fishes of the grater Southwest: chronicle of a vanishing biota. University of Arizona Press, Tucson.

Minckley, W.L., Meffe, G.K., and Soltz, D.L. 1991. Conservation and management of short-lived fishes: the Cyprinodontoids. In: Battle against extinction: native fish management in the American West. W.L. Minckley, J.E. Deacon (eds.), pp 247-282. The University of Arizona Press, Tucson.

NatureServe, Hendrickson D, and Valdes Gonzales A, 2019. *Cyprinodon eremus*. In: The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T191303A82960949. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T191303A82960949.en. [Accessed on 11 II 22].

R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Reyment, R.A. 1982. Multivariate morphometrics. In: Handbook of Statistics 2: Classification Pattern Recognition and Reduction of Dimensionality. P.R. Krishnaiah, L.N. Kanal (ed.), pp 721-745. Elsevier, North Holland, Amsterdam.

Rodríguez-Ramírez, R., Echelle, A.A., Varela-Romero, A., Grijalva-Chon, J.M., Pacheco-Hoyos, N., and Torres-López, M.A. 2023. Genetic evaluation of the refuge program for Sonoyta pupfish (Cyprinodontidae: *Cyprinodon eremus*) in Mexico. Journal of ichthyology. 63: 6, 1149-1156 DOI: 10.1134/S0032945223060140.

Strauss, R.E., and Bookstein, F.L. 1982. The truss: body form reconstructions in morphometrics. *Systematics Zoology* 31, 113-135, DOI: 10.1093/sysbio/31.2.113.

Tobler, M., and Carson, E.W. 2010. Environmental variation, hybridization, and phenotypic diversification in Cuatro Ciénegas pupfishes. Journal of Evolutionary Biology. 23: 1475-1489, DOI: 10.1111/j.1420-9101.2010.02014.x.

Turan, C. 1999. A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: The Truss System. Turkish Journal of Zoology 23:259-263.

Wilcox, J.L., and Martin, A.P. 2006. The devil's in the details: genetic and phenotypic divergence between artificial and native populations of the endangered pupfish (*Cyprinodon diabolis*). Animal Conservation 9, 316-321, DOI: 10.1111/j.1469-1795.2006.00039.x.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary table 1. Principal Components Analysis summary for *C. eremus* females. All the Principal Components are shown, their eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance.

Tabla suplementaria 1. Resumen del Análisis de Componentes Principales para las hembras *C. eremus*. Se muestran todos los Componentes Principales, sus autovalores, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulada.

Principal Component	Eigenvalue	Percentage of variance	Cumulative percentage of variance
Principal Component 1	10.385	25.330	25.330
Principal Component 2	5.464	13.327	38.657
Principal Component 3	3.291	8.026	46.683
Principal Component 4	2.856	6.965	53.648
Principal Component 5	1.841	4.489	58.138
Principal Component 6	1.734	4.228	62.366
Principal Component 7	1.526	3.722	66.087
Principal Component 8	1.372	3.346	69.433
Principal Component 9	1.206	2.942	72.374
Principal Component 10	1.058	2.581	74.955
Principal Component 11	1.016	2.478	77.433
Principal Component 12	0.939	2.290	79.723
Principal Component 13	0.864	2.107	81.830
Principal Component 14	0.782	1.907	83.738
Principal Component 15	0.696	1.698	85.436
Principal Component 16	0.649	1.583	87.019
Principal Component 17	0.597	1.455	88.474
Principal Component 18	0.522	1.273	89.747
Principal Component 19	0.489	1.193	90.940
Principal Component 20	0.463	1.130	92.070
Principal Component 21	0.395	0.962	93.032
Principal Component 22	0.381	0.929	93.961
Principal Component 23	0.287	0.699	94.660
Principal Component 24	0.272	0.663	95.323
Principal Component 25	0.261	0.636	95.960
Principal Component 26	0.234	0.570	96.530
Principal Component 27	0.229	0.559	97.089
Principal Component 28	0.185	0.452	97.541
Principal Component 29	0.171	0.417	97.958
Principal Component 30	0.159	0.388	98.346
Principal Component 31	0.124	0.303	98.649
Principal Component 32	0.118	0.287	98.936
Principal Component 33	0.096	0.235	99.171
Principal Component 34	0.065	0.160	99.330
Principal Component 35	0.064	0.156	99.486
Principal Component 36	0.060	0.146	99.632
Principal Component 37	0.049	0.118	99.750
Principal Component 38	0.038	0.093	99.843
Principal Component 39	0.036	0.087	99.930
Principal Component 40	0.020	0.048	99.978
Principal Component 41	0.009	0.022	100

Supplementary table 2. Contribution of each variable to the first five Principal Components in the PCA for *C. eremus* females.
Tabla suplementaria 2. Contribución de cada variable a los primeros cinco Componentes Principales en el ACP para las hembras de *C. eremus*.

Character	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Dorsal length of head	0.0087	1.2287	14.5306	1.0073	1.2437
Upper lip – Center of the eye	0.1905	1.4202	7.4826	2.2152	0.2027
Head length	0.0000	3.0259	9.8181	5.5030	0.0445
Preanal length	1.3449	5.9523	1.1118	4.2622	3.1700
Prepelvic length	4.4698	4.8511	0.3855	2.9661	0.3140
Ventral length of head	0.3864	1.9233	5.4001	0.7780	6.4097
Length of upper jaw	3.2733	1.3930	1.1742	4.4196	0.1827
Lower lip – Center of the eye	0.1568	2.2097	7.1520	1.1069	0.1734
Occiput – Dorsal fin origin	1.9476	1.6739	0.1469	1.0430	7.8714
Occiput – Pelvic fin origin	5.4459	0.4527	0.8304	3.7536	0.0443
Occiput – Isthmus	4.1115	4.2722	0.6140	0.8561	0.2164
Length of depressed dorsal fin	1.8243	3.8582	0.0020	3.1207	1.1533
Length of dorsal fin base	4.4878	1.6547	0.0172	7.1377	0.1156
Dorsal fin origin – Base of the last anal fin ray	6.3516	2.6368	1.3475	0.0135	0.0032
Body depth	8.0888	0.1881	1.0052	0.0186	0.2613
Dorsal fin origin – Isthmus	6.1461	0.2131	0.0133	0.4343	1.4010
Dorsal length of caudal peduncle	2.2670	2.7064	5.6126	3.5229	0.1246
Base of the last dorsal fin ray – Ventral base of the caudal fin	0.0352	7.8507	3.5532	4.1896	0.0161
Anterior depth of caudal peduncle	5.9668	2.2485	2.1717	0.3784	0.2205
Base of the last dorsal fin ray – Pelvic fin origin	7.4653	0.1589	0.9335	0.0839	0.5642
Depth of caudal peduncle	5.8106	4.1835	0.0066	0.3976	0.0002
Dorsal base of the caudal fin – Base of the last anal fin ray	0.0042	8.2923	4.3005	3.5591	6.2474
Ventral length of caudal peduncle	3.8866	2.9026	1.0788	1.6713	7.6280
Base of the last anal fin ray – Pelvic fin origin	0.6382	0.0129	1.3122	3.5401	6.3243
Length of depressed anal fin	0.2042	8.2842	0.0189	2.9811	0.9898
Length of pelvic fin	0.3302	6.0794	3.8599	0.0000	6.1808
Pelvic fin origin – Isthmus	3.5141	4.3903	0.0218	2.9247	1.4048
Length of pectoral fin	0.5195	3.7250	6.8255	1.7178	0.2353
Length of pectoral fin base	3.9349	0.2714	0.3357	0.0246	0.4428
Eye diameter	0.4816	0.2607	11.9743	1.1347	0.3070
Interorbital width	2.2774	0.0023	0.1211	4.0871	13.6219
Head width	0.1755	4.6747	0.8143	2.1701	9.5027
Width of gape	2.4212	2.8997	1.0667	0.9393	1.4473
Body width	6.0851	0.2059	1.0624	1.0207	1.7812
Scales from the dorsal fin origin to anal fin origin	1.4424	0.9295	0.0357	0.0619	4.3412
Caudal peduncle scale count	2.4048	0.5725	0.1872	1.1563	1.4176
Dorsal fin rays	0.1960	0.0024	0.0153	1.0788	2.0977
Anal fin rays	0.0279	0.1543	1.8445	8.9752	3.5809
Pectoral fin rays	0.2641	0.1019	0.5696	0.1164	7.0393
Pelvic fin rays	0.0000	1.6501	0.1131	15.3607	1.6023
Caudal fin rays	1.4133	0.4861	1.1336	0.2718	0.0747

Supplementary table 3. Principal Components Analysis summary for *C. eremus* males. All the Principal Components are showed, their eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance.
Tabla suplementaria 3. Resumen del Análisis de Componentes Principales para los machos *C. eremus*. Se muestran todos los Componentes Principales, sus autovalores, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulada.

Principal Component	Eigenvalue	Percentage of variance	Cumulative percentage of variance
Principal Component 1	7.978	19.459	19.459
Principal Component 2	5.088	12.410	31.869
Principal Component 3	3.962	9.664	41.533
Principal Component 4	3.301	8.052	49.585
Principal Component 5	2.518	6.143	55.727
Principal Component 6	1.933	4.715	60.442
Principal Component 7	1.692	4.126	64.568
Principal Component 8	1.530	3.731	68.299
Principal Component 9	1.319	3.217	71.516
Principal Component 10	1.153	2.813	74.329
Principal Component 11	1.077	2.626	76.955
Principal Component 12	0.917	2.237	79.192
Principal Component 13	0.894	2.180	81.372
Principal Component 14	0.859	2.095	83.467
Principal Component 15	0.781	1.905	85.372
Principal Component 16	0.669	1.632	87.004
Principal Component 17	0.605	1.475	88.479
Principal Component 18	0.590	1.438	89.917
Principal Component 19	0.484	1.181	91.099
Principal Component 20	0.391	0.953	92.052
Principal Component 21	0.379	0.924	92.976
Principal Component 22	0.344	0.839	93.815
Principal Component 23	0.331	0.808	94.623
Principal Component 24	0.323	0.788	95.411
Principal Component 25	0.297	0.724	96.135
Principal Component 26	0.214	0.521	96.656
Principal Component 27	0.199	0.484	97.141
Principal Component 28	0.183	0.446	97.587
Principal Component 29	0.157	0.384	97.971
Principal Component 30	0.141	0.345	98.316
Principal Component 31	0.122	0.298	98.614
Principal Component 32	0.108	0.263	98.877
Principal Component 33	0.097	0.236	99.112
Principal Component 34	0.091	0.223	99.335
Principal Component 35	0.063	0.153	99.488
Principal Component 36	0.057	0.139	99.627
Principal Component 37	0.050	0.122	99.749
Principal Component 38	0.037	0.091	99.840
Principal Component 39	0.034	0.084	99.924
Principal Component 40	0.019	0.047	99.971
Principal Component 41	0.012	0.029	100.000

Supplementary table 4. Contribution of each variable to the first five Principal Components in the PCA for *C. eremus* males.
Tabla suplementaria 4. Contribución de cada variable a los primeros cinco Componentes Principales en el ACP para los machos de *C. eremus*.

Character	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Dorsal length of head	4.550	3.994	0.419	0.369	0.136
Upper lip – Center of the eye	3.640	2.253	3.467	0.409	6.651
Head length	7.320	2.256	0.004	0.839	2.324
Preanal length	0.339	5.731	2.444	1.653	2.815
Prepelvic length	1.285	2.565	0.397	12.677	1.286
Ventral length of head	3.888	2.449	7.679	0.010	1.710
Length of upper jaw	0.992	5.866	0.144	1.104	1.357
Lower lip – Center of the eye	1.576	6.645	3.489	0.008	4.003
Occiput – Dorsal fin origin	0.043	4.049	0.570	5.510	0.029
Occiput – Pelvic fin origin	4.543	0.071	0.479	6.344	0.160
Occiput – Isthmus	8.123	1.351	0.447	0.093	0.615
Length of depressed dorsal fin	3.509	1.499	1.899	7.500	0.603
Length of dorsal fin base	2.686	0.513	11.391	0.012	1.666
Dorsal fin origin – Base of the last anal fin ray	8.795	2.188	0.628	0.109	0.084
Body depth	9.148	0.957	0.101	1.725	0.962
Dorsal fin origin – Isthmus	3.550	4.139	0.619	4.408	1.801
Dorsal length of caudal peduncle	0.254	0.025	7.065	0.398	13.844
Base of the last dorsal fin ray – Ventral base of the caudal fin	0.682	0.514	10.589	0.744	7.103
Anterior depth of caudal peduncle	4.088	4.443	3.351	0.013	1.016
Base of the last dorsal fin ray – Pelvic fin origin	3.154	6.517	0.465	0.025	0.274
Depth of caudal peduncle	6.409	0.493	0.131	1.145	1.786
Dorsal base of the caudal fin – Base of the last anal fin ray	0.895	0.304	5.803	0.009	9.178
Ventral length of caudal peduncle	0.693	1.406	1.530	0.967	11.585
Base of the last anal fin ray – Pelvic fin origin	0.075	6.373	0.003	1.427	1.126
Length of depressed anal fin	2.366	1.460	0.172	11.487	0.267
Length of pelvic fin	0.454	0.000	4.214	11.650	0.048
Pelvic fin origin – Isthmus	0.015	0.575	4.870	1.695	10.753
Length of pectoral fin	2.876	0.411	1.992	4.929	1.281
Length of pectoral fin base	2.314	0.281	0.416	1.601	1.042
Eye diameter	0.865	5.936	0.709	0.056	0.228
Interorbital width	2.837	0.003	4.184	5.746	3.576
Head width	1.229	7.844	2.066	0.134	1.024
Width of gape	1.802	7.223	3.227	0.461	0.542
Body width	2.753	3.108	0.527	4.127	0.003
Scales from the dorsal fin origin to anal fin origin	1.154	0.254	0.817	0.048	3.709
Caudal peduncle scale count	0.113	2.257	0.650	4.431	0.153
Dorsal fin rays	0.005	0.006	7.409	1.595	0.369
Anal fin rays	0.311	0.059	4.440	0.012	0.213
Pectoral fin rays	0.439	0.001	0.627	0.183	0.888
Pelvic fin rays	0.116	0.029	0.566	0.155	3.761
Caudal fin rays	0.111	3.951	0.001	4.194	0.025

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 3. Respiración del suelo y emisiones de gases efecto invernadero

Bagasse and bagasse compost from agave tequilero in contrasting soils: 3. Soil respiration and greenhouse gas emissions

Laura Liliana Acosta Sotelo[1], Eduardo Salcedo Pérez[1]*, Gerardo Sergio Benedicto Valdés[2], Juan Fernando Gallardo Lancho[3], Juan Francisco Zamora Natera[1], Josefina Casas Solís[1]

[1] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara. Carretera a Nogales, km 15,5, Predio Las Agujas, Zapopan. Jalisco, México.
[2] Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México.
[3] C.S.I.C., IRNASa (jubilado). Salamanca 37008, España.

RESUMEN

El estudio de respiración del suelo (emisión microbiana de CO_2) por incorporación de residuos orgánicos (RO) provenientes de la agroindustria (bagazo y composta de bagazo), permite estimar el efecto ambiental en relación a la emisión de CO_2 por la mineralización del carbono durante su proceso de descomposición, lo cual debe ser considerado desde el punto de vista de cambio climático. Por lo anterior, el objetivo fue evaluar la dinámica de emisión de CO_2 por la mineralización de cuatro materiales lignocelulósicos, incorporados en suelos de diferente textura. Mediante la técnica de respiración alcalina se cuantificó la respiración de CO_2 en Regosol y Luvisol por incorporación de dos bagazos (TBD y TBA) y sus compostas (TCD y TCA) durante 30 d bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Los tratamientos TBD y TBA incrementaron la actividad microbiológica con mayores emisiones; mientras que los tratamientos TCD y TCA incrementaron el contenido de C orgánico suelo (COS) con menores emisiones. La emisión de CO_2 se relacionó con la mineralización de los RO y ésta a su vez con su composición química y su resistencia a la descomposición, además la dinámica de las emisiones fue diferente por tipo de material y por tipo de suelo. La incorporación de RO de tipo bagazos es una opción para incrementar la actividad microbiana edáfica, pero con mayor emisiones de gases de efecto invernadero (GEI); mientras que los RO de compostas generan un incremento en la captura de COS y, por ende, mayor almacén de C y una menor emisión de CO_2.

Palabras claves: residuos orgánicos, tasa de mineralización, cinética del carbono

ABSTRACT

The study of soil respiration (microbial CO_2 emission) due to the incorporation of organic waste (RO) from agroindustry (bagasse and bagasse compost), allows estimating the environmental effect in relation to the CO_2 emission, due to carbon mineralization during its decomposition process, which must be considered from the climate change point of view. Therefore, the objective was to evaluate the CO_2 emission dynamics due to the mineralization of four lignocellulosic materials, incorporated into soils of different textures. Using the alkaline respiration technique, CO_2 respiration was quantified in Regosol and Luvisol by incorporating two bagasse (TBD and TBA) and their composts (TCD and TCA) for 30 d under controlled humidity and temperature conditions. The TBD and TBA treatments increased microbiological activity with higher emissions, while the TCD and TCA treatments increased the soil organic C (COS) content with lower emissions. The CO_2 emission was related to the mineralization of the RO and this in turn to its chemical composition and resistance to decomposition; in addition, the dynamics of the emissions were different by type of material and of soil. The incorporation of bagasse type RO is an option to increase soil microbial activity, but with greater greenhouse gas (GHG) emissions; while composted RO generates an increase in the capture of COS and, therefore, a greater store of C and a lower emission of CO_2.

Keywords: organic waste, mineralization rate, carbon kinetics

INTRODUCCIÓN

Se considera que la respiración del suelo (emisión microbiana de CO_2) es uno de los componentes principales del ciclo del carbono y su evaluación permite conocer la dinámica del mismo dentro del contexto de generación de gases efecto invernadero (GEI), aumento de las reservas de carbono edáfico y su consecuente impacto al cambio climático (Srivastava *et al*., 2012; Ryan *et al*., 2018; Pörtner *et al*., 2022). La emisión de CO_2 es el resultado de diversos procesos biológicos como la respiración de los macro y microorganismos edáficos, de las raíces vivas de la rizosfera, además de los residuos orgánicos en descomposición (López *et al*., 2020). Se ha encontrado que, dentro de los principales factores que regulan los flujos de CO_2 se encuentran: a) la precipitación (Hussain *et al*., 2011), b) la humedad edáfica, c) la temperatura ambiental (Davidson *et al*., 2002), d) el tipo de vegetación (Scholze *et al*., 2003) y e) el carbono orgánico del suelo (COS; Pardo *et al*., 2019); por tanto, estos factores se consideran de gran interés, ya que regulan la variación e intensidad de la respiración

*Autor para correspondencia: Eduardo Salcedo Pérez
Correo-e: eduardo.salcedo@acedemicos.udg.mx
Recibido: 12 de octubre de 2023
Aceptado: 20 de febrero de 2024
Publicado: 8 de abril de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2178

del suelo (Yáñez *et al*., 2017). En este contexto, se considera que la respiración edáfica es una de las mayores fuentes de emisiones de CO_2 hacia la atmósfera (Ru *et al*., 2018), ya que, en un año, se emiten cerca de 220 Pg (10^{15} g) de CO_2 por los microorganismos edáficos (Mátyás *et al*., 2020); parte de estas emisiones se generan por mal manejo agrícola, por desforestación, quema de biomasa o de residuos de cultivo, entre otras acciones antropogénicas (Chi *et al*., 2020). Por ello, los microrganismos desempeñan un papel vital como indicadores biológicos, los cuales pueden ser evaluados mediante diferentes técnicas: a) midiendo respiración de CO_2; b) cuantificando la mineralización del nitrógeno; y c) determinando la biomasa microbiana (tanto su contenido en C, como de N; Bünemann *et al*., 2018). Estos indicadores microbiológicos se consideran muy sensibles, ya que proveen información de los cambios generados del estrés ambiental y actividades antrópicas (Pardo *et al*., 2019). Además, se considera que la activad microbiológica es fundamental para mantener la calidad de los suelos y aspectos primordiales en la determinación del estado de un sistema o comprender cómo la actividad humana modifica los sistemas y con ello, los ciclos biogeoquímicos (Bastida *et al*., 2008). Conocer el ciclo del C es necesario para entender el porqué del incremento acelerado de la concentración de CO_2 en la atmósfera, así como definir las estrategias de mitigación basadas en el suelo y la vegetación (Sanz-Cobena *et al*., 2017). Por lo tanto, la determinación cuantitativa de las emisiones edáficas de CO_2 contribuye a valorar las estrategias que minimicen estos flujos (López *et al*., 2020) dado que pequeños cambios en la respiración del suelo (y el consiguiente retorno del CO_2 a la atmósfera) pueden afectar la dinámica global del ciclo del C (Wei *et al*., 2014). En este sentido la respiración basal, la biomasa microbiana (C_{min} que cuantifica la cantidad global de microrganismos existentes en el suelo en promedio oscila entre el 1 y el 4 % del C orgánico edáfico Paolini, 2018), la cuantificación de grupos funcionales (Sánchez *et al*., 2005), o el ritmo de mineralización del C (que denota la intensidad de la actividad microbiana; Guerrero *et al*., 2012), permiten conocer cómo el crecimiento de la microbiología edáfica influye en la respiración, la cual es sensible a los cambios generados en periodos cortos de tiempo (Zhang *et al*., 2013); sin embargo, estas variables están generalmente determinadas por la calidad y cantidad de la materia orgánica del suelo (MOS, Gallardo, 2017).

En los principales sistemas de producción agrícola del occidente de México (maíz y agave tequilero) es habitual el uso continuo de agroquímicos y la escasa adición de abonos orgánicos, lo cual afecta negativamente la composición y abundancia de microorganismos edáficos (Zeng *et al*., 2016), modifica el ciclo de la MOS y el contenido de las poblaciones microbianas (Bünemann *et al*., 2018). Por lo tanto, la incorporación de residuos orgánicos (RO) crudos o compostados son una alternativa para incrementar la fertilidad de los suelos, el contenido de MOS y nutrientes, así como mejorar la agregación y estabilidad estructural edáfica (Gallardo, 2017). El bagazo se genera durante el proceso de producción del tequila, tras someter la piña o tallo del agave (*Agave tequilana* Weber var. *Azul*) a diferentes procesos de extracción de azúcares; se considera un material combustible de segunda generación y lenta mineralización, al estar constituido por biomasa lignocelulósica (43 % celulosa, 19 % hemicelulosa y 15 % lignina; Li *et al.* 2012) lo cual puede reducir parcialmente las emisiones de CO_2 (Chávez, 2010). Por otro lado, el compostaje bioxidativo del bagazo de agave, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación, con la participación de grupos microbianos en las distintas etapas del proceso (Abad *et al*., 2004), origina un material orgánico estabilizado (composta de bagazo de agave) que al incorporarse a suelos con bajos contenidos de MO, puede generar efectos positivos sobre la fertilidad edáfica integral y por lo tanto, beneficios en el crecimiento de cultivos (Zucconi *et al*., 1987b). Por lo anterior, los bagazos tequileros y sus derivados compostados pueden utilizarse como insumos orgánicos para mejorar el suelo, ya que su incorporación puede constituir una excelente alternativa de uso con efectos benéficos en sus propiedades físicas, químicas y biológicas; pero por otro lado, las emisiones de CO_2 por la descomposición de éstos materiales en el suelo, también generan un efecto negativo en la generación de GEI y el cambio climático, hasta ahora no considerado en las evaluaciones de dichas prácticas agrícolas por la incorporación de insumos orgánicos y de materiales lignocelulósicos al suelo. Conocer el ciclo del C es necesario para entender el porqué del incremento acelerado de la concentración de CO_2 en la atmósfera, así como las estrategias de mitigación basadas en el suelo y la vegetación, ya que el C es el elemento fundamental en los componentes de la naturaleza orgánica, el cual se encuentra en los océanos, la atmósfera y el suelo.

Dado que en trabajos anteriores (Acosta *et al*., 2023a,b) se evaluó el comportamiento de la descomposición y dinámica mineralización del C y N de estos RO, se conoce la repercusión de los bagazos de agave sobre la fertilidad edáfica al ser incorporados al suelo; sin embargo, no ha sido reportada hasta el momento la liberación de CO_2 que se emiten a la atmósfera; por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la dinámica de emisión del CO_2 y la intensidad de mineralización de dos tipos de bagazo de agave versus sus compostas, en Regosol y Luvisol. En este contexto, la presente investigación pretende dar respuesta en la toma de decisiones respecto a la incorporar de bagazo de agave sin transformar o ya compostado al suelo; no solo considerando los efectos positivos en los parámetros de fertilidad edáfica; sino que a la vez, se pueda valorar el efecto negativo ambiental que ocasionan las emisiones de CO_2 como GEI derivado de la descomposición de este tipo de materiales lignocelulósicos cuando se incorporan a suelos con diferente contenido de arcilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos etapas, fase de campo y fase de laboratorio.

Fase de campo: En el 2019 se estableció un experimento

en macetas con capacidad de 19 L con suelos de diferente textura y de acuerdo a la clasificación FAO (WRB, 2015) corresponden a Regosol (Rg) y Luvisol (Lv).

Las macetas de ambos suelos fueron distribuidas bajo un diseño experimental de bloques al azar con cinco tratamientos, dos tipos de bagazo (TBD, bagazo de difusor y TBA, bagazo de autoclave), dos compostas una por cada tipo de bagazo (TCD y TCA) y un control (T0) sin aplicación de RO; tres repeticiones para cada tratamiento, las cuales se mantuvieron bajo condiciones naturales, hasta el momento de la evaluación en la fase de laboratorio.

Se realizaron tres aplicaciones de los cuatro RO (2019, 2020 y 2021); la dosis anual aplicada fue de 92 g base seca por maceta para el suelo Regosol (Rg) y 103 g para el Luvisol (Lv), lo cual equivale a 20 ton ha^{-1} $año^{-1}$ en función a la densidad aparente de cada suelo. Las propiedades de los suelos se muetran en la Tabla 1, mientras que las características químicas de los residuos orgánicos (RO: TBD, TBA, TCD y TCA) se presentan en la Tabla 2.

Fase de laboraotrio: Despues de 30 meses se realizó la experimentación de respirometría en el laboratorio de Física y Química de Suelos del Colegio de Posgraduados (*Campus* Montecillos, Texcoco, Estado de México), donde se cuantificó la respirometría de los dos suelos tras adiciones periódicas de RO de agave a los suelos. Se colectó una muestra compuesta por tratamiento (1 kg de suelo), la cual fué secada durante 5 d a temperatura ambiente; posteriormente el suelo se tamizó a un tamaño de partícula de 0.53. De cada muestra se tomaron tres porciones de 100 g para el ensayo de respirometría. Las muestras se llevaron a capacidad de campo por tipo de tratamiento y suelo, para el Rg los tratamientos T0, TBD, TBA, TCD y TCA con (19, 15, 16, 15 y 15 mL agua kg^{-1}, respectivamente) en Lv T0, TBD, TBA, TCD y TCA con (18, 18, 18, 19 y 20 mL agua kg^{-1}, respectivamente), manteniéndose así durante los 30 d del ensayo.

Tabla 1. Propiedades físicas de los suelos empleados en este estudio.
Table 1. Physical properties of the soils used in this study.

Suelo	Partículas minerales %			Textura	D_{ap} (Mg m^{-3})
	Arena	Limo	Arcilla		
Regosol	59.8	26.0	14.2	Franco arenosa	1.09
Luvisol	33.8	36.0	30.2	Franco limosa	0.97

Tabla 2. Características de los residuos orgánicos empleados en el experimento.
Table 2. Characteristics of the organic waste used in the experiment.

Tratamiento	COS	NTS	R: C/N
TBD	40.9	0.56	74.0
TBA	41.2	0.52	79.0
TCD	23.7	1.85	12.8
TCA	23.3	1.28	18.3

Tratamientos: TBD, Tratamiento con bagazo difusor; TBA, Tratamiento con bagazo autoclave; TCD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y TCA, Tratamiento con composta bagazo autoclave. COS: Carbono orgánico del suelo y NTS: Nitrógeno total del suelo.
Treatments: TBD, Treatment with diffuser bagasse; TBA, Treatment with autoclave bagasse; TCD: Treatment with diffuser bagasse compost; and TCA, Treatment with autoclave bagasse compost. COS: Soil organic cabon and NTS: Total soil nitrogen.

Evaluación de respirometría

La evaluación de la respiración aerobia se llevó a cabo durante 30 d en laboratorio (Moyano *et al.*, 1987; Gallardo, 2017). Los 100 g de suelo de cada unidad experimental se colocaron en recipientes de plástico de 500 mL. Todos los tratamientos fueron humedecidos a su capacidad de campo en el momento de los ensayos (Tabla 3). Se utilizó el método de incubación en medio cerrado con 5 mL de NaOH 1 N (Anderson, 1984). La cuantificación de la liberación de C-CO_2 se determinó a temperatura ambiente a lo largo de 30 d de incubación. El desprendimiento de CO_2 se midió cada 48 horas, estimándose mediante titulación con HCL al 0.1 N en presencia de tres gotas de fenolftaleína al 1 %, se adicionaron 3.0 mL de $BaCl_2$ al 2 %, para precipitación de los carbonatos. Se utilizaron tres blancos, para controlar la presencia de CO_2 en los frascos (Anderson, 1982), con los resultados obtenidos en la evaluación de respirometríca se determinaron las siguientes variables.

La primera variable, emisión de C-CO_2, se evaluó midiendo el CO_2 liberado (absorbido en la solución alcalina) durante

Tabla 3. Emisiones de CO_2 por héctarea estimadas a partir de los valores acumulados resgistrados durantes los 30 días.
Table 3. CO_2 emissions per hectare estimated from the accumulated values recorded during the 30 days.

Tratamientos	Valores acumulados	Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2*
Regosol (Rg)		
T0	548	12.0
TBD	1547	33.7
TBA	1682	36.6
TCD	1131	24.6
TCA	985	21.5
Luvisol (Lv)		
T0	784	15.2
TBD	1883	36.5
TBA	1480	28.7
TCD	898	17.4
TCA	970	18.8

Tratamientos: TBD, Tratamiento con bagazo difusor; TBA, Tratamiento con bagazo autoclave; TCD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y TCA, Tratamiento con composta bagazo autoclave. *La estimación de las emisiones de CO_2 en campo se calculó a partir del peso de una héctarea consiederando 20 cm de profundidad y la densidad para Rg y Lv (D_{ap} 1.09 y 0.97 Mg m^{-3}), multiplicada por el valor acumulado de las determinaciones de respiración en laboratorio.
Treatments: TBD, Treatment with diffuser bagasse; TBA, Treatment with autoclave bagasse; TCD: Treatment with diffuser bagasse compost; and TCA, Treatment with autoclave bagasse compost.
*The estimate of CO_2 emissions in the field was calculated from the weight of one hectare considering 20 cm depth and the density for Rg and Lv (Dap 1.09 and 0.97 Mg m^{-3}), multiplied by the value accumulated from laboratory respiration determinations.

la respiración aeróbica en suelos y puede utilizarse como un índice de la intensidad de respiración (Guerrero *et al*., 2012; Monsalve *et al*., 2017) mediante la siguiente fórmula:

$$R = (B - M) * N * E$$

Dónde: R = Respiración microbiana en mg CO_2; B = Volumen de ácido gastado para titular el NaOH de los blancos (mL); M = Volumen de ácido necesaria para titular el NaOH de las muestras (mL); N = Normalidad del HCl; E = Peso equivalente del CO_2.

La curva acumulativa se determinó sumando todos los mg de CO_2 que se produjeron cada 48 horas para cada tipo de suelo.

La segunda variable respirometría, se cuantificó considerando la evolución de la emisión del CO_2 desprendido en función del tiempo, para lo cual se ajustó a un modelo potencial (Dommergues, 1968):

$$Co = k * t^m$$

Dónde: C_o = pérdidas acumuladas de C orgánico como CO_2 en función del tiempo (expresada en mg C-CO_2 g^{-1} de material orgánico seco a 65 °C); *k* = constante que corresponde a la emisión del primer día (expresada en mg C-CO_2 g^{-1} de material orgánico seco a 65 °C); t = tiempo (d); m = constante que determina la forma de curva.

Esta evolución del C_o desprendido como CO_2 en función del tiempo se ajustó al modelo potencial propuesto por Dommergues (1968). Al derivar el modelo $C = k*t^m$ se obtiene la expresión:

$$dC/dt = k * m * t(m^{-1})$$

Que corresponde a la intensidad respiratoria (Chase y Gray, 1957; Dommergues, 1968), dónde los valores de los coeficientes *k*∗m y (m^{-1}) representan la actividad biológica y la magnitud de la pérdida de C_o en función del tiempo, respectivamente (Levi *et al*., 1990).

La tercera variable, tasa de mineralización del C orgánico, se calculó con base al porcentaje, considerando las cantidades acumuladas de C orgánico (desprendidas como CO_2) respecto al contenido inicial de COS de las muestras edáficas (Dommergues, 1968):

$$Tm = (\sum_{i=0\ día}^{i=30\ día} C - CO_2/COS) * 100)$$

Dónde: T_m= tasa de mineralización, expresada en porcentaje; C-CO_2= carbono desprendido como CO_2 expresado en mg C·g^{-1} de material orgánico seco a 65 °C. (30 d); COS = carbono orgánico del suelo presente al inicio del experimento, expresado en mg C g^{-1} de material orgánico seco a 65 °C.

Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias significativas entre los valores medios de cada tratamiento, también se realizó el test de Sahpiro-Wilks para evaluar la normalidad de los datos utilizados para saber entre que tratamientos existen diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey ($P > 0.05$) empleando el paquete estadístico *Statgraphics Centurión* XVII (Statgraphics, 2014). En la evaluación de la evolución del C_o desprendido como CO_2 en función del tiempo se ajustó al modelo potencial propuesto por Dommergues (1968) donde se generó una ecuación lineal para las curvas acumuladas del CO_2 desprendido de los tratamientos; una vez obtenida la ecuación lineal se realizó una regresión lineal simple y se obtuvieron los valores de la pendiente (m) los cuales fueron positivos para todos los tratamientos, lo cual refleja el aumento en la tasa de pérdida del carbono orgánico en el transcurso de las incubaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emisión de C-CO_2 mediante incubación aerobia

Los resultados encontrados en el presente trabajo muestran que la dinámica de emisiones de CO_2 es diferente, debido a la composición química de cada RO y su nivel de estabilidad ante la descomposición microbiana, independientemente de la relación C/N (TBA y TBD versus TCA y TCD); así como el tipo de suelo al que es incorporado (Regosol, Rg versus Luvisol, Lv); además dicho parámetro resultó útil para estimar si las emisiones resultan significativas respecto a los valores reportados de GEI y su impacto al cambio climático (Figura 1 a y b). En este sentido, la respiración microbiana del suelo muestra el desprendimiento de CO_2 generado como resultado de la actividad de los microorganismos (García y Rivero, 2008), los cuales responden rápidamente a la incorporación de abonos orgánicos y la adición de agua durante los primeros días de las incubaciones (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013); por lo tanto, el aumento de las poblaciones microbianas genera un incremento en la emisión de CO_2 el cual puede ser implementado como indicador de la actividad biológica del suelo (Albíter *et al*., 2020).

Las emisiones de CO_2 presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre suelos y entre tratamientos (Figura 1 a y b); además, la dinámica de las emisiones fue diferente entre suelos, con mayores diferencias en el Rg; mientras que en Lv, fue practicamente igual el comportamiento entre tratamientos, lo que indica que suelos con mayor contenido de arcillas generan emisiones similares entre materiales; sin embargo entre tratamientos el comportamiento fue similar entre RO, excepto para el tratamiento TBD, el cual mostró picos diferentes de emisión respecto a los otros tratamientos (Figura 1 a y b). En Rg fue diferenciado entre tratamientos, siendo el TBD el que presentó a los 5 d la mayor emisión (38.4 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}) con un segundo pico a los 11 d (21.1 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}); por otro lado, los tratamientos TBA, TCD y TCA presentaron un comportamiento similar después de los 11 d; sin embargo la mayor emisión fue a los 9 d (30.1, 37.3 y 34.9 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente), con un segundo pico de emisión menor a los 11 d (6.0, 10.8 y 6.9 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente); finalmente el T0 presentó los menores

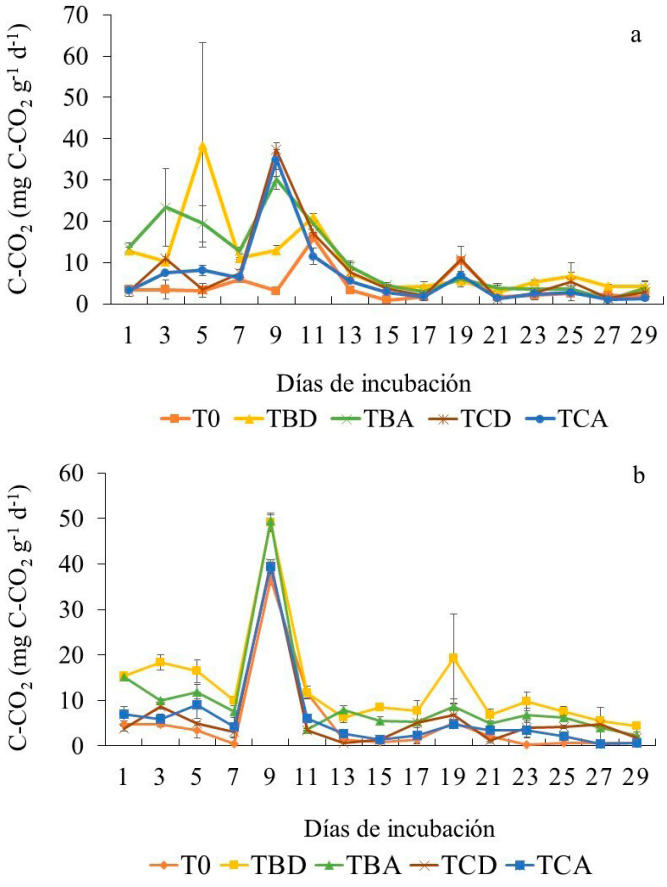


Figura 1. Desprendimiento de CO_2 en suelo Regosol (a) y Luvisol (b) en 30 días de incubación. Tratamientos: To, Control; TBD, Tratamiento con bagazo difusor; TBA, Tratamiento con bagazo autoclave; TCD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y TCA, Tratamiento con composta bagazo autoclave. Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P<0.05$).
Figure 1. Release of CO_2 in Regosol (a) and Luvisol (b) soil in 30 days of incubation. Treatments: To, Control; TBD, Treatment with diffuser bagasse; TBA, Treatment with autoclave bagasse; TCD: Treatment with diffuser bagasse compost; and TCA, Treatment with autoclave bagasse compost. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P<0.05$).

valores **c**on un primer pico a los 11 d (16 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, con un segundo pico de emisión menor a los 19 d (10.4 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}). Respecto al Lv, todos los tratamientos (T0, TBD, TBA, TCD, TCA), presentaron un comportamiento similar, observandose un pico de emisión mayor en el d 9 (36.7, 49.1, 49.6, 40.2 y 39.4 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente) y, al igual que en Rg, el tratamiento TBD fue el que presentó los menores picos de emisiones desde 3l d 3, el d 19 y el d 23 (18.4, 19.2, 9.7 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}).

Considerando el valor promedio final de las 15 lecturas de los 30 d, las emisiones de CO_2 entre tratamientos presentaron diferencias significativas, siendo los tratamientos de bagazo (TBA y TBD) los que mostraron los mayores valores, seguido de los tratamientos con composta (TCA y TCD), finalmente el menor valor de emisión fue el control (T0) en ambos suelos (Rg y Lv). En el Rg para TBA, TBD, TCD y TCA fue de 10.4, 10.0, 7.8 y 6.5 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente, mientras que el valor obtenido en T0 fue de 4.1 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}; para el Lv TBD, TBA, TCD y TCA los valores promedio de los tratamientos fueron 13.1, 10.1, 6.3 y 6.2 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente, mientras que el valor promedio del control T0 fue de sólo 5.0 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}. Por lo anterior, la incorporación de abonos orgánicos, residuos de cosecha o agroindustriales y compostas tiene un efecto positivo en el restablecimiento de las principales propiedades edáficas físicas, químicas y biológicas (Castelo-Gutiérrez *et al*., 2016; Orozco *et al*., 2016), principalmente en el contenido de humus y COS (Kwiatkowski *et al*., 2020), los cuales suponen un aporte de energía y nutrientes para los microorganismos del suelo (Smith y Paul, 1990). Así, durante los primeros días de incubación se presentaron las mayores emisiones (entre los d 7 y 11), lo cual se debe a la manifestación inicial de la actividad microbiológica por la incorporación de RO ricos en fracciones lábiles como por ejemplo proteínas y azúcares, disminuyendo según transcurre el tiempo de incubación hasta instaurarse de nuevo la respiración basal (Paolini, 2018). En este sentido la incorporación de RO genera una respuesta de los microorganismos telúricos, sirviendo de indicador la actividad respiratoria de las comunidades microbianas que implican cambios en el ritmo de descomposición de la MOS, ya sea reduciéndolo o activándolo (Zhu y Cheng, 2011; Cheng *et al*., 2014).

Tras ese periodo, el desprendimiento de CO_2 en la incubación comienza a estabilizarse tras el día 13 según el tipo de RO añadido en el experimento, lo que significa que va disminuyendo la cantidad de microorganismos de acuerdo con la emisión de CO_2, (Guerrero *et al*., 2012). No obstante, es evidente un pequeño pico de actividad secundaria sobre el d 19, lo que significa que los microorganismos como los hongos, actinomicetos y bacterias cumplen diversas funciones, especielmente en la descomposición de los RO (Luna y Mesa *et al*., 2016) ya que estos se alimentan de los restos y metabolitos de los microorganismos muertos y en etapa de latencia tras la anterior manifestación microbiana (Benedicto *et al*., 2019), al final del mes se obtienen valores similares a los de la respiración basal.

Acumulación de las emisiones de CO_2 durante los 30 días de muestreo

Las curvas muestran el comportamiento de las emisiones de C-CO_2 acumuladas durante los treinta días (Figura 2 a y b), muestran una dinámica diferente entre tratamientos por tipo de RO incorporado; ya que los tratamientos con bagazo (TBD y TBA) presentaron las mayores emisiones acumuladas, seguidas por las compostas (TCD y TCA); los T0 como era de esperarse, presentaron los valores mas bajos. En Rg las diferencias entre tratamientos fueron mas evidentes, los tratamientos TBD y TBA fueron los que presentaron las mayores emisones (103 y 112 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente), pero con una dinámica similar, lo mismo se presentó para las compostas (TCD y TCA) con valores de 75 y 66 mg C-CO_2 g^{-1}, respectivamente, menores al 60 %, el T0 fue de 37 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}. En Lv se presenta un comportamiento similar entre todos los tratamientos, sin embargo a partir de los 9 d los valores de las emisiones de las curvas acumuladas entre

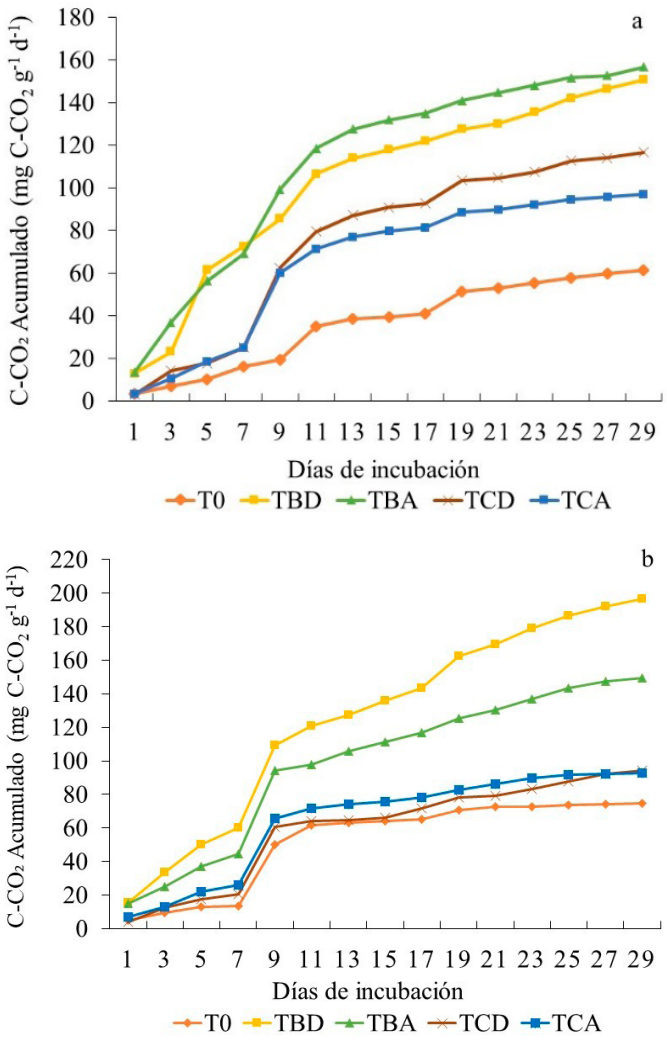


Figura 2. Respiración acumulada de las muestras seleccionadas a lo largo de un mes en suelos Regosol (a) y Luvisol (b). Tratamientos: To; Control; BD, Tratamiento con bagazo difusor; BA, Tratamiento con bagazo autoclave; CD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y CA, Tratamiento con composta bagazo autoclave.

Figure 2. Accumulated respiration of the selected samples over a month in Regosol (a) and Luvisol (b) soils. Treatments: To, Control; BD, Treatment with diffuser bagasse; BA, Treatment with autoclave bagasse; CD: Treatment with diffuser bagasse compost; and CA, Treatment with autoclave bagasse compost.

tratamientos cambia significativamente, siendo más evidente en los tratamientos con bagazo (TBD y TBA) presentando valores de emisión de 126 y 99 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente, mientras que las compostas y el control (TCD, TCA y T0) permanencen estables a partir del día 9 con valores de 60, 65 y 52 mg C-CO_2 g^{-1} d^{-1}, respectivamente. Las diferencias anteriores se atribuyen al contenido de C presente en los diferentes RO empleados (Tabla 2), de forma particular en los tratamientos TBD y TBA, los cuales adicionan material orgánico fresco y biodisponible de rápida degradación por los microorganismos (Camacho *et al*., 2014) y que participan en la mineralización de compuestos tales como azúcares, proteínas y degradación de aminoácidos a compuestos más sencillos (Oviedo *et al*., 2017).

Los resultados encontrados de las emisiones acumuadas indican que durante los primeros siete días posteriores a la incorporación de RO, se presenta un periodo de estabilización y activación microbiológica, el cual es de gran importancia para la descomposición de los mismos durante los siguientes días, lo cual dependerá de la composición quimica de los RO y de su nivel de estabilidad ante la descomoposición microbiana, ya que como se pudo observar los bagazos (TBD y TBA) con valores mayores de relación C/N en comparación con las compostas (TCD y TCA); sin embargo, su descomposición fue acelerada los primeros días, lo cual se reflejó con los mayores valores de emisiones acumuladas, mientras que las compostas, al ya tener un proceso previo de descomposición y una mayor estabilidad ante los microorganismos, presentó menores valores de emisiones acumuladas, pero podrá presentar una mayor acumulación de la MOS, en este sentido Xu *et al*. (2019) establecen que cuanto más estable se encuentre la MOS, los flujos de CO_2 y actividad microbiológica disminuirán, ya que se tendrá una menor cantidad de compuestos lábiles, lo que limita la actividad microbiana (Ayuso *et al*., 1996; Guerrero *et al*., 2012).

Los resultados encontrados son similares a los obtenidos por Barrales *et al*. (2015), quienes muestran que la mayor respiración de CO_2 se encontró en los rastrojos de maíz sin compostar (4.2 g CO_2) en comparación con la composta (1.2 g CO_2), al ser el último un material prácticamente estabilizado, así mismo la relación C/N influye de manera significativa sobre el proceso de la descomposición y las emisiones de CO_2, encontrando que el rastrojo de maíz presenta una relación C/N de 74.6 mientras que la composta de sólo 17.9. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos con los dos tratamientos TBA y TBD, que presentan relaciones C/N de 79.2 y 74.0, mientras que los dos tratamientos TCA y TCD tienen relaciones C/N de 18.2 y 12.8 (Tabla 2).

Considerando los resultados expuestos y a partir de los valores de emisiones acumuladas encontradas en el trabajo, se estimó los valores de emisiones generados por hectárea, considerando una profundidad de -20 cm y las densidades para cada suelo (Rg y Lv) resultando lo siguiente para cada tratamiento en cada suelo; en Rg los mayores valores de emisión fueron para el TBD y TBA (33.7 y 36.6 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2); mientras que para las compostas (TCD y TCA) fue de 24.6 y 21.5 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2, el T0 presentó una emisión de 12 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2; por otro lado, en LV los valores mayores también fueron para los TBD y TBA (36.5 y 28.7 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2; en las compostas (TCD y TCA) fueron de 17.4 y 18.8 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2, en el T0 de 15.2 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2 (Tabla 3). Lo anterior muestra que el impacto de las emisiones de GEI con incorporación de residuos agroindustriales a suelos con baja fertilidad, no representan un mayor impacto respecto al cambio climático por la aplicación de RO, ya que si restamos los valores de los tratamientos sin RO también emiten CO_2 a valores menores, pero si se presenta; además, si consideramos lo reportado por algunos autores de emisiones de CO_2 podemos comparar dichos emisiones con las estimadas en el presente trabajo; en este sentido

ArchMiller y Samuelson (2016), estimaron emisiones entre 12.0 Mg de C para un rodal de 5 años con plántulas en etapa de pasto y 13.9 Mg de C en el rodal denso de 21 años. Mientras que Cruz-Sánchez *et al*. (2021), en rodales de masas puras encontraron mayores cantidades de emisines que fluctuaron entre 39.27 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ y 67.96 Mg ha^{-1} $año^{-1}$, considerando lo anterior, podemos decir que nuestras estimaciones se encuentran dentro de lo reportado por ambos autores.

Las altas relaciones C/N en los tratamientos con bagazos ocasionan, efectos negativos fundamentalmente en las propiedades bioquímicas edáficas en comparación con los tratamientos con las compostas al presentar relaciones C/N más ajustadas (Collins *et al*., 1990; Gallardo, 2017; Acosta-Sotelo *et al*., 2023a).

Cinética de mineralización del C orgánico emitido como CO_2

Los valores de la evolución del C_o desprendido como CO_2 en los diferentes tratamientos en Rg y Lv mostraron variación de 13.5 a 3.1 mg C-CO_2·g^{-1} y 15.4 a 3.8 mg C-CO_2·g^{-1}, respectivamente (Tabla 4), lo cual puso deberse al tipo de suelo, ya que, Luvisol tuvo el mayor desprendimiento de CO_2 en comparación con el Regosol, lo anterior se da por el efecto protector de las arcillas (Gili *et al*., 2011).

En Rg los mayores valores se presentaron en TBA y TBD (13.5 y 12.8 mg C-CO_2·g^{-1}, respectivamente), mientras que los menores valores se presentaron en el To y en las dos compostas TCA y TCD (3.5, 3.2 y 3.1 mg C-CO_2·g^{-1}, respectivamente). En suelo Lv se presentó una dinámica similar, encontrando que los mayores valores se obtuvieron en TBD y TBA (con 15.4 mg C-CO_2·g^{-1} para ambos), y los valores más bajos se encontraron en TCA, T0 y TCD (con 7.0, 4.8 y 3.8 mg C-CO_2·g^{-1} respectivamente).

Tabla 4. Valores de C_o, constantes de mineralización (*k*) y su producto.
Table 4. Co values, mineralization constants (*k*), and their product.

		C_o	*k*	C_o*k
Tratamientos		mg C-CO_2·g^{-1}	día^{-1}	mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1}
T0	Regosol	3.4	4.5	15.4
TBD		12.8	9.1	117
TBA		13.5	9.6	129
TCD		3.1	8.5	26.2
TCA		3.2	6.9	21.9
T0	Luvisol	4.8	5.4	25.6
TBD		15.4	13.1	201.2
TBA		15.4	9.8	149.6
TCD		3.8	6.4	24.5
TCA		7.0	6.3	44.6

Tratamientos: TBD, Tratamiento con bagazo difusor; TBA, Tratamiento con bagazo autoclave; TCD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y TCA, Tratamiento con composta bagazo autoclave.
Treatments: TBD, Treatment with diffuser bagasse; TBA, Treatment with autoclave bagasse; TCD: Treatment with diffuser bagasse compost; and TCA, Treatment with autoclave bagasse compost.

Con respecto a la constante de velocidad (*k*) para ambos suelos se presentó el mismo comportamiento, los tratamientos TBD (13.1 y 9.1 d^{-1} en Rg y Lv respectivamente), y TBA (9.8 y 9.6 d^{-1}, respectivamente); así mismo, los tratamientos con las compostas TCD y TCA en ambos suelos presentaron los valores más bajos (con 8.5 y 6.9 d^{-1} en Rg y 6.4 d^{-1} en ambos tratamientos en Lv), al igual con que control T0 con (5.4 y 4.2 en Rg y Lv d^{-1}, respectivamente).

Respecto al producto C_o**k* en el Rg el mayor incremento se observó en los tratamientos TBA y TBD (129 y 117 mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1} respectivamente), seguido de los tratamientos con compostas (TCD y TCA con 26.2 y 21.9 mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1}, respectivamente), mientras que el valor más bajo se observó en el control T0 con 15.4 mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1}; dichos valores se pueden deber al tipo de RO empleado y tipo de suelo. En el Lv se presentó la misma dinámica con relación a los tratamientos, pero con valores más altos; se encontró para TBD y TBA (201 y 150 mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1}, respectivamente) y para los tratamientos TCA, T0 y TCD (44.6, 25.6 y 24.5 mg C-CO_2·g^{-1} d^{-1}, respectivamente) se observaron los valores más bajos.

Por lo tanto, los resultados encontrados en C_o, *k* y C_o**k* presentaron el mismo comportamiento en la mineralización de los RO en los tratamientos con incorporación de bagazos (TBD y TBA) aunado a un mayor incremento en la actividad microbiológica, en comparación con los tratamientos de compostas de esos mismos materiales ya compostados y estabilizados. De acuerdo con el modelo potencial propuesto por Dommergues (1968) los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a lo reportado por Rakesh *et al*. (2021), quienes encontraron valores para C_o en residuos de maíz de 25.8 a 16.6 y de 23.3 a 20.1 mg C-CO_2·g^{-1}; estos valores son similares a los encontrados en los dos tratamientos con bagazos TBD y TBA en ambos suelos, donde se encuentran valores de 13.5 a 12.8 mg C-CO_2·g^{-1} en Rg y 15.4 mg C-CO_2·g^{-1} en Lv, encontrando que estos residuos frescos y ricos en C tuvieron el más alto potencial de mineralización (C_o) en comparación con los tratamientos de compostas TCD y TCA (3.1 a 3.2 mg C-CO_2·g^{-1} en Rg y 3.8 a 7.0 mg C-CO_2·g^{-1} en Lv, respectivamente); sin embargo, estos valores de C_o obtenidos no dependen específicamente del tipo de residuo o suelo, sino que se encuentran regulados por la humedad y la actividad de los microorganismos, los cuales tienen un papel primordial en la determinación de la calidad del suelo (Pathan *et al*., 2018). Aunado a lo anterior la humedad edáfica genera cambios en la actividad microbiana, con lo que se modifica el C_o (Qi *et al*., 2011).

Con respecto a los valores de *k* Moreno *et al*. (2014) mencionaron que la fracción de C orgánico disuelto (COD) inicial de los RO es la que controla el proceso de descomposición y cuanto más alto son sus valores, más rápidos será la mineralización; ello se evidencia en los valores obtenidos (Tabla 4) en los tratamientos con los bagazos (oscilantes entre 13.1 a 9.1 día^{-1} en TBA y TBD para ambos suelos), mientras que en los tratamientos con compostas los valores fueron ligeramente menores (oscilando entre 8.5 a 6.4 d^{-1} en TCD y TCA para ambos suelos). Los resultados anteriores de C_o y *k* obtenidos

en los tratamientos de bagazos BD y BA concuerdan con lo reportado por Liyanage *et al*. (2021), quienes encontraron que los residuos de abono verde de *Gliricidia* presenta una descomposición más acelerada y alta en *k* y el C_o.

Respecto a los valores de C_o*k son similares a los encontrados por Nourbakhsh y Sheikh (2006), quienes obtuvieron valores en residuos de maíz de 200 mg $C\text{-}CO_2 \cdot g^{-1}\ d^{-1}$ en suelos no salinos, mientras que este trabajo se obtuvieron valores de 129 a 117 $C\text{-}CO_2 \cdot g^{-1}\ d^{-1}$ en Rg y 201 a 150 $C\text{-}CO_2 \cdot g^{-1}\ d^{-1}$ en Lv; lo anterior demuestra que el modelo antes mencionado, es más preciso en cuanto a los cambios generados en el C orgánico de acuerdo con la calidad de los residuos empleados (Pascual *et al*., 1998).

Tasa de Mineralización del $C\text{-}CO_2$ por día

Los resultados de la tasa de mineralización del $C\text{-}CO_2$ mensual se presentan en la Figura 3 para ambos suelos. En el Rg los tratamientos TBA y TBD son los que presenta una mayor actividad microbiana (con valores de 3.1 y 2.4 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$, respectivamente), lo que también se refleja en una mayor tasa de mineralización diaria, lo cual indica que su estabilización en el suelo dependerá de las características del RO, siendo diferente significativamente de los tratamientos TCD y TCA (1,9 y 1,4 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$, respectivamente) que, al ser materiales más estables, sus tasas indican una menor mineralización; por otra parte, el To, al no sufrir incorporación de RO, refleja la mineralización basal con el mínimo valor (0.9 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$).

En el Lv se presenta una tendencia similar al del Rg, ocurriendo la mayor tasa significativa de mineralización en TBD y TBA (1.8 y 1.3 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$, respectivamente), seguido de la respiración basal To (1.0 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$), mientras que las menores tasas de mineralización se presentaron en TCA y

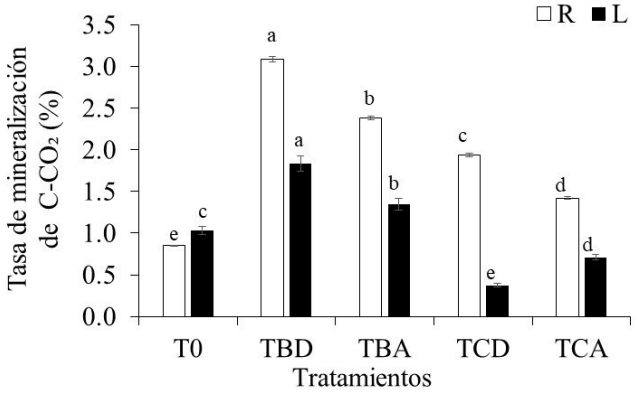


Figura 3. Tasa de mineralización de $C\text{-}CO_2$ mensual en suelo Regosol (R) y Luvisol (L), durante 30 d de incubación. Tratamientos: To, control; BD, Tratamiento con bagazo difusor; BA, Tratamiento con bagazo autoclave; CD: Tratamiento con composta de bagazo difusor; y CA, Tratamiento con composta bagazo autoclave. Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0.05$).

Figure 3. Monthly $C\text{-}CO_2$ mineralization rate in Regosol (R) and Luvisol (L) soil, during a 30-d incubation period. Treatments: To, control; BD, Treatment with diffuser bagasse; BA, Treatment with autoclave bagasse; CD: Treatment with diffuser bagasse compost; and CA, Treatment with autoclave bagasse compost. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P < 0.05$).

TCD (0.7 y 0.4 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$, respectivamente), con lo cual se puede indicar cierto efecto depresivo de las compostas sobre la actividad microbiana (Ngo *et al*., 2013).

Los resultados obtenidos en la tasa de mineralización a los 30 días de incubación, concuerdan con lo mencionado por varios autores (Azeez y Van Averbeke, 2010; Mohanty *et al*., 2013), quienes indicaron que la relación C/N de los RO influye en la tasa de mineralización y un incremento de esta indica que existe un mayor contenido de C_o disponible para la actividad de microorganismos (Rahman, 2013; Hossain *et al*., 2017), lo cual se reflejo en nuestros resultados con una respuesta mayormente significativa en la tasa de mineralización de los tratamientos TBD (3.1 y 1.8 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$) y TBA (2.4 y 1.3 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$, respectivamente para ambos suelos), presentando relaciones C/N muy altas (74 y 79, respectivamente); esto contrasta con los tratamientos de las compostas TCD y TCA (1.9 y 1.4 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$ en Rg y 0.7 y 0.4 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$ en Lv, respectivamente) con bajas relaciones C/N (12,8 y 18,3 respectivamente; Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Hossain *et al*. (2017), quienes adicionaron abonos orgánicos de carbonilla ("*biochar*") de paja de arroz y vermicomposta encontrando valores en la tasa de mineralización de 3.0 y 4.6 mg $C\text{-}CO_2$ $g^{-1}\ d^{-1}$; lo anterior demuestra que una relación C/N baja genera una disminución en la tasa de descomposición de los RO (Ferrera y Alarcón, 2001).

Los resultados encontrados en los tratamientos con incorporación de bagazo TBD y TBA difieren con los reportados por Datta *et al*. (2019), quienes observaron una mayor tasa de mineralización de los RO con la incorporación de varias combinaciones de RO de frijol *mungo* con arroz, trigo o maíz, lo cual lo atribuyeron a un mayor contenido de N (1.30 a 0.62 mg $N\ g^{-1}$) y una menor relación C/N (41 a 57), lo cual coincide con lo reportado por varios autores (Ambus y Jensen, 1997; Giacomini *et al*., 2007) que indicaron que una relación más estrecha entre el suelo y los RO incorporados facilita una mayor tasa de mineralización de los RO, cabe mencionar que el contenido de humedad y temperatura modifican dicha mineralización (Awad *et al*., 2012), aunque en esta experimentación esas variables son similares en todas las muestras.

CONCLUSIONES

Las emisiones de CO_2 por la incorporación de residuos organicos agroindustriales (bagazo y composta de bagazo tequilero) a un Regosol y un Luvisol, (valor mayor estimado 35 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2 y valor menor estimado 15 Mg ha^{-1} $año^{-1}$ de CO_2), las cuales no representan valores fuera de los rangos reportados y su impacto al cambio climático no resulta mayor a lo que se emite de manera natural en ecosistemas agrícolas y forestales dentro del ciclo normal del carbono.

La dinamica de las emisiones de CO_2 fue diferente entre suelos y entre tratamientos, sobre todo dentro de los primeros 20 d de evaluación de la respiración, siendo el Regosol el que mostró mayores diferencias entre los tratamientos. El TBD fue el que presentó mayores diferencias de emisiones en ambos suelos.

El comportamiento de las emisiones acumuladas, permitió agrupar los tratamientos por tipo de RO, los dos bagazos TBD y TBA en ambos suelos fueron los que presentaron los valores mayores de emisiones acumuladas, seguidos de las compostas TCD y TCA; finalmente los tratamientos T0 como era de esperarse, presentaron las menores emisiones. En Luvisol, las compostas y el control a partir del día 9 presentaron estabilidad en emisiones. En Regosol, se diferenciaron a partir del día 11 y se agruparon por bagazos, compostas y control.

Los valores encontrados de la evolución de emisión de CO_2 desprendido en función del tiempo (C_o, k y C_o*k), así como la tasa de mineralización, permitieron agrupar la dinámica en la mineralización de los RO por tipo de materiales; los bagazos presentaron valores mayores, mientras que en las compostas fueron menores, independientemente del tipo de suelo para ambos grupos.

La incorporación de RO de tipo bagazos, es una opción para incrementar la actividad microbiana edáfica, pero con mayor emisión de GEI; mientras que los RO de compostas generan un incremento en la captura de COS y, por ende, mayor almacén de C y una menor emisión de CO_2.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores no expresan conflicto de interés.

REFERENCIAS

Abad, B.M., Noguera, M.P. y Carrión. B.C. 2004. Los sustratos en los cultivos sin suelo. En: G.M. Urreztarazu (Ed.). Tratado de cultivo sin suelo. pp 113-158. Mundi-Prensa, Madrid (España).

Acosta Sotelo, L.L., Zamora Natera, J.F., Rodríguez Macías, R., González Eguiarte, D.R., Gallardo Lancho, J.F. y Salcedo Pérez, E. 2023b. Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 1. Dinámica de degradación: Dinámica de degradación de Bagazo y composta. Biotecnia. 25: 90-96.

Acosta Sotelo, L.L., Zamora Natera, J.F., Rodríguez Macías, R., Jiménez Plascencia, C., Gallardo Lancho, J.F. y Salcedo Pérez, E. 2023a. Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 2. Dinámica de mineralización del carbono y nitrógeno: Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero. Biotecnia. 25: 5-11.

Albíter, P.J.F., Vaca, R., del Aguila P., Yáñez, O.G., Lugo, J. 2020. Flujo de CO_2 y su relación con propiedades bioquímicas en cultivos hortícolas en invernadero. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7: 1-12.

Ambus, P. y Jensen, E.S. 1997. Nitrogen mineralization and denitrification as influenced by crop residue particle size. Plant and Soil. 197: 261-270.

Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. En: Page AL, Miller RH, Keeney DR. Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties (ed.), pp 831-871. American Society of Agronomy and Soil Science of America. Madison, Wisconsin, USA.

Anderson, J.P.E. 1984. Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. Soil Biology and Biochemistry. 16: 483-489.

ArchMiller, A.A. y Samuelson, L.J. 2016. Intra-annual variation of soil respiration across four heterogeneous longleaf pine forests in the southeastern United States. Forest Ecology and Management. 359: 370-380.

Awad, Y.M., Blagodatskaya, E., Ok, Y.S. y Kuzyakov, Y. 2012. Effects of polyacrylamide, biopolymer, and biochar on decomposition of soil organic matter and plant residues as determined by 14C and enzyme activities. European Journal Soil Biology. 48: 1-10.

Ayuso, M., Pascual, J.A. García, C. y Hernández, T. 1996. Evaluation of urban wastes for agricultural use. Soil Science and Plant Nutrition. 42: 105-111.

Azeez, J.O. y Van Averbeke, W. 2010. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. Bioresource Technology. 101: 5645- 5651.

Base referencial mundial del recurso suelo (WRB) IUSS Working Group. 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos. No. 106. Tercera Edición. FAO©. Viale delle Terme di Caracalla, Roma, Italia. 218 p. Disponible en: https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/clasificacion-de-suelos/base-referencial-mundial/es.

Barrales-Brito, E., Guerrero-Ortiz, P.L., Estrada-Herrera, I., Hernández-López, F.J. y Benedicto-Valdés, S.G. 2015. Dinámica de carbono en un suelo con la adición de diferentes tipos de materia orgánica. En: Paz, F., J. Wong y R. Torres. Serie Síntesis Nacionales. Programa Mexicano del Carbono en colaboración con el Centro del Cambio Global y la Sustentabilidad en el Sureste, A.C y el Centro Internacional de Vinculación y Enseñanza de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. (ed.), pp 232-238. Texcoco. Estado de México., México.

Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T. y García, C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. Geoderma. 147:159-171.

Benedicto-Valdés, G.S., Montoya-García, C.O., Vicente-Hernández, Z., Ramírez-Ayala, C. y Escalante-Estrada, J.A.S. 2019. Incorporación de abonos orgánicos y liberación de C-CO_2 como indicador de la mineralización del carbono. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 6: 513-522.

Bonilla, C.C.R., Díaz, J., Gil, C., Girón, K., León, M., Ortiz, O. y Suarez, A. 2020. Dinámica de la descomposición de residuos orgánicos. Suelos Ecuatoriales. 50: 31-39.

Bünemann, E.K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R.E., De Deyn, G., de Goede R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J.W. y Brussaard, L. 2018. Soil quality – A critical review. Soil Biology Biochemistry. 120:1 05-125.

Blagodatskaya, E. y Kuzyakov. Y. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. Soil Biology Biochemistry. 67: 192-211.

Camacho, D.A., Martínez, L., Ramírez, S.H., Valenzuela, R. y Valdés, M. 2014. Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. Terra Latinoamericana. 32: 291-300.

Castelo-Gutiérrez, A.A., García-Mendívil, H.A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Arellano-Gil, M., Figueroa-López, P. y Gutiérrez-Coronado, M.A. 2016. Residual mushroom compost as soil conditioner and bio-fertilizer in tomato production. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 22: 83-93.

Collins, H.P., Elliot, L.F., Rickman, R.W., Bezdicek, D.F. y Papendick. R.I. 1990. Decomposition and interactions among wheat residue components. Soil Science Society of America Journal. 54: 780-785.

Chase, F.E. y Gray, P.H.H.. 1957. Application of the Warburg respirometer in studying respiratory activity in soil. Canadian Journal of Microbiology. 3: 335-349.

Chávez, G.L. 2010. Uso de bagazo de la industria mezcalera como materia prima para generar energía. Ingenierías. 13: 8-16.

Cheng, W., Parton, W.J., Gonzalez-Meler, M.A., Phillips, R., Asao, S., McNickle, G.G., Brzostek, E. y Jastrow, J.D. 2014. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. New Phytologist. 201: 31-44.

Chi, Y., Yang, P., Ren, S., Ma, N., Yang, J. y Xu, Y. 2020. Effects of fertilizer types and water quality on carbon dioxide emissions from soil in wheat-maize rotations. Science of The Total Environment. 698: 1-9.

Cruz-Sánchez, Y., López-Teloxa, L.C., Gómez-Diaz, J.D. y Monterroso-Rivas, A.I. 2021. Respiración del suelo en un bosque templado de México y su relación con el carbono orgánico. Madera y Bosques. 27:1-17.

Datta, A., Jat, H.S., Yadav, A.K., Choudhary, M., Sharma, P.C., Rai, M., Singh, L.K., Majumder, S.P., Choudhary, V. y Jat, M.L. 2019. Carbon mineralization in soil as influenced by crop residue type and placement in an *Alfisols* of Northwest India. Carbon Management. 10: 37-50.

Davidson, E.A., Belk, E. y Boone. R.D. 2002. Soil water content and temperatura as independent or confounded factors controlling soil respiration in a temperate mixed hardwood forest. Global Change Biology. 4: 217-227.

Dommergues, Y. 1968. Dégagement tellurique de CO_2: Mesure et signification. Annales du Institute Pasteur. 4: 626-656.

Ferrera, R. y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Ciencia Ergo Sum 8: 175-183.

Gallardo, J.F. 2017. La materia orgánica de suelos: Residuos orgánicos, *humus*, compostaje y captura de carbono. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco (México). I.S.B.N.: 978-607-12-0474-5. 424 pp.

García, A. y Rivero, C. 2008. Evaluación del carbono microbiano y la respiración basal en respuesta a la aplicación de lodo papelero en los suelos de la Cuenca del Lago de Valencia, Venezuela. Revista Facultad de Agronomía (Maracay). 34: 215-229.

Giacomini, S.J., Recous, S., Mary, B. y Aita, C. 2007. Simulating the effects of N availability, straw particle size and location in soil on C and N mineralization. Plant and Soil. 301: 289-301.

Gili, P., Irisarri, J., Tasile, V., Behemer, S., Starik, C. y Sagardoy, M. 2011. Descompactación de suelos de huertos de manzanos (*Malus domestica* Borkh.) bajo riego en el alto valle de río negro-argentina. Agro Sur. 39: 67-78.

Guerrero, O.L., Quintero, L.R., Espinoza, H.V., Benedicto, V.G.S. y Sánchez, C.M.J. 2012. Respiración de CO_2 como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. Terra Latinoamericana. 30: 355-362.

Li H., Foston, M. B., Kumar, R., Samuel R., Gao X., Hu F., Ragauskas, A.J. y Wyman, C.E. 2012. Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock. RSC Advances. 2: 4951-4958.

Hossain, M.B, Rahman, M.M., Biswas, J.C., Miah, M.M.U., Akhter, S., Maniruzzaman, M., Choudhury, A.K., Ahmen, F., Shiragi, K. y Kalra, N. 2017. Carbon mineralization and carbon dioxide emission from organic matter added soil under different temperature regimes. International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture. 6: 311-319.

Hussain, M.Z., Grunwald, T., Tenhunen, J.D., Li, Y.L. Mirzae. H., Bernhofer, C., Otieno, D., Dinh, N.Q. Schmidt, M., Wartinger, M. y Owen, K. 2011. Summer drought influence on CO_2 and water fluxes of extensively managed grassland in Germany. Agriculture, Ecosystems & Environment. 141: 67-76.

Iñiguez, G., Martínez, G.A., Flores, P.A. y Virgen, G. 2011. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distinta de bagazo de Agave para la obtención de un substrato para jitomate. Revista internacional de contaminación ambiental. 27: 47-59.

Kwiatkowski, C., Harasim, E. y Staniak, M. 2020. Effect of catch crops and tillage systems on some chemical properties of loess soil in a short-term monoculture of spring wheat. Journal of Elementology. 25: 35- 43.

Levi, M.R., Riffaldi, R., y Saviozzi, A. 1990. Carbon mineralization in soil amended with different organic materials. Agriculture, Ecosystems & Environment. 31: 325-335.

Liyanage, L.R.M.C., Sulaiman, M.F., Ismail, R., Gunaratne, G.P., Dharmakeerthi, R.S., Rupasinghe, M.G.N., Mayakaduwa, A.P. y Hanafi, M.M. 2021. Carbon mineralization dynamics of organic materials and their usage in the restoration of degraded tropical tea-growing soil. Agronomy. 11: 1-18.

López, T.L.C., Monterroso, R.A.I. y Gómez, D.J.D. 2020. Diseño de calibración para cuantificar emisiones de CO (respiración del suelo) durante intervalos diurnos. Agrociencia. 54: 731-745.

Luna, F.M.A. y Mesa, R.J.R. 2016. Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. Revista científica Agroecosistemas. 4: 31-40.

Mátyás, B, Lowy, D.A., Singla, A., Meléndez, J.R. y Sándor, Z. 2020. Comparación de los efectos ejercidos por los biofertilizantes, los fertilizantes NPK y los métodos de cultivo sobre la respiración del suelo en el suelo de chernozem. La granja. Revista de Ciencias de la Vida. 32: 8-18.

Mohanty, S., Nayak, A.K., Kumar, A., Tripathi, R., Shahid, M., Bhattacharyya, P., Raja, R. y Panda, B.B. 2013. Carbon and nitrogen mineralization kinetics in soil of rice-rice system under long term application of chemical fertilizers and farmyard manure. Europan Journal of Soil Biology. 58: 113-121.

Monsalve-C., O.I., Gutiérrez-D., J.S. y Cardona, W.A. 2017. Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo. Una revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 11: 200-209.

Moreno-Cornejo, J., Zornoza, R. y Faz, A. 2014. Carbon and nitrogen mineralization during decomposition of crop residues in a calcareous soil. Geoderma. 230-231: 58-63.

Moyano, A., San Miguel, C. y Gallardo, J.F. 1987. Estudio respirométrico *in vitro* de horizontes superficiales de tres suelos enriquecidos con materia orgánica. Anu. Cent. Edaf. Biol, Aplic. Salamanca. 12: 183-190.

Ngo, P.T., Rumpel, C., Ngo, Q.A., Alexis, M., Velásquez, V.G., Mora, G.M.L., Dang, D.K. y Jouquet, P. 2013. Biological and chemical reactivity and phosphorus forms of buffalo manure compost,

vermicompost and their mixture with biochar. Bioresource Technology 148: 401-407.

Nourbakhsh, F. y Sheikh-Hosseini, A.R. 2006. A kinetic approach to evaluate salinity effects on carbón mineralization in a plant residue amended soil. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 7: 788-793.

Orozco, A., Valverde, M., Trélles, R., Chávez, C. y Benavides, R. 2016. Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. Terra Latinoamericana. 34: 441-456.

Oviedo, O.E.R., Marmolejo, R.L.F. y Torres, L.P. 2017. Avances en investigación sobre el compostaje de biorresiduos en municipios menores de países en desarrollo. Lecciones desde Colombia. Ingeniería Investigación y Tecnología. 38: 31-42.

Paolini, G.J.E. 2018. Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. Terra Latinoamericana. 36: 13-22.

Pathan, S.I., Vˇetrovský, T., Giagnoni, L., Datta, R., Baldrian, P., Nannipieri, P. y Renella, G. 2018. Microbial expression profiles in the rhizosphere of two maize lines differing in N use efficiency. Plant and Soil. 433:401-413.

Pardo P.Y.J., Paolini, G.J.E. y Cantero, G.M.E. 2019. Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 22: e1144.

Pascual, J.A., Hernández, T., García, C. y Ayuso, M., 1998. Carbon mineralization in an arid soil amended with organic wastes of varying degrees of stability. Communication in Soil Science and Plant Analysis. 29: 835-846.

Pörtner, H.O., Roberts, D.C., Poloczanska, E.S., Mintenbeck, K., Tignor, M., Alegría, A., Craig, M., Langsdorf, S., Löschke, S., Möller, V. y Okem, A. 2022. *IPCC, 2022: resumen para responsables de políticas*. En: Cambio climático 2022: Impactos, adaptación y vulnerabilidad: contribución del grupo de trabajo II al sexto informe de evaluación del panel intergubernamental sobre cambio climático. Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, EE. UU., págs. 3-33.

Qi, G., Wang, Q., Zhou, W., Ding, H., Wang, X., Qi, L., Wang, Y., Li, S. y Dai, L. 2011. Moisture effect on carbon and nitrogen mineralization in topsoil of Changbai Mountain, Northeast China. Journal of Forest Science. 57: 340-348.

Rahman, M.M. 2013. Nutrient-use and carbon accumulation efficiencies in soils from different organic wastes in rice and tomato cultivation. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 44:1457-1471.

Rakesh, S., Sarkar, D., Sinha, A.K., Shikha., Mukhopadhyay, P., Danish, S., Fahad, S. y Datta, R. 2021. Carbon mineralization rates and kinetics of surface-applied and incorporated rice and maize residues in entisol and inceptisol soil types. Sustainability. 13: 1-16.

Ru, J., Zhou, Y., Hui, D., Zheng, M. y Wan, S. 2018. Shifts of growing-season precipitation peaks decrease soil respiration in a semiarid grassland. Glob Chang Biol. 24: 1001-1011.

Ryan, E.M., Ogle, K., Kropp, H., Samuels-Crow, K.E., Carrillo, Y. y Pendall, E. 2018. Modeling soil CO_2 production and transport with dynamic source and diffusion terms: Testing the steady-state assumption using DETECT v1.0. Geosci Model Dev. 11: 1909-1928.

Sánchez, B., Ruiz, M. y Ríos, M. 2005. Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. Agronomía Tropical. 55: 507-534.

Sanz-Cobenaa, A., Lassalettab, L., Aguilera, E., del Prado, A., Garnier, J., Billen, G., Iglesias, A., Sánchez, B., Guardia, G., Abalos, D., Plaza-Bonilla, D., Puigdueta-Bartolomé, I., Moral, R., Galánd, E., Arriaga, H., Merino, P., Infante-Amate, J., Meijide, A., Pardo, G., Álvaro-Fuentes, J., Gilsanz, C., Báez, D., Doltra, J., González-Ubierna, S., Cayuela, M.L., Menéndez, S., Díaz-Pinés, E., Le-Noë, J., Quemada, M., Estellés, F., Calvet, S., van Grinsven, H.J.M., Westhoek, H., Sanz, M.J., Gimeno, B.S., Vallejo, A. y Smith, P. 2017. Strategies for greenhouse gas emissions mitigation in Mediterranean agriculture: A review. Agriculture, Ecosystems and Environment. 238:5-24.

Scholze, M., Knorr, W. y Heimann, M.M. 2003. Modelling terrestrial vegetation dynamics and carbon cycling for an abrupt climatic change event. The Holocene. 13: 327-333.

Smith, J.L. y Paul, E.A. 1990. The significance of soil microbial biomass estimations. En: J.M. Bollag y G. Stotzky. Soil biochemistry (ed.), pp 357-396. Marcel Dekker. New York (N. Y., USA).

Srivastava, M., Sharma, S.D. y Kudrat, M. 2012. Effect of crop rotation, soil temperature and soil moisture on CO_2 emission rate in Indo-Gangetic plains of India. International Journal Agriculture and Forestry. 2: 117-120.

Statgraphics Centurion. 2014. User Manual, versión 17 (8.0). Statgraphics Centurion, Herndon, Virginia, USA.

Wei, S., Zhang, X., McLaughlin, N.B., Liang, A., Jia, S., Chen, X. y Chen, X. 2014. Effect of soil temperature and soil moisture on CO_2 flux from eroded landscape positions on black soil in Northeast China. Soil and Tillage Research. 144: 119-125.

Xu, W., Yuan, W., Cui, L., Ma, M. y Zhang, F. 2019. Responses of soil organic carbon decomposition to warming depend on the natural warming gradient. Geoderma. 343: 10-18.

Yáñez, D.M.I., Cantú, S.I., González, R.H., Marmolejo, M.J.G., Jurado, E. y Gómez, M.M.V. 2017. Respiración del suelo en cuatro sistemas de uso de la tierra. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 8: 123-149.

Zeng, J., Liu, X., Song, L., Lin, X., Zhang, H., Shen, C. y Chu, H. 2016. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. Soil Biology and Biochemistry. 92: 41-49.

Zucconi, F., Monaco, A. y Foster. M. 1987b. Phytotoxines during the estabilization of organic matter, Pp. 73-86. En: J.K.R. Glasser (ed.). Composting of agricultural and other wastes. Elsevier Applied Science Publ., New York (*U.S.A.*), 320 pp.

Zhang, H., Li, G., Song, X., Yang, D., Li, Y., Qiao, J., Zhang, J. y Zhao, S. 2013. Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land. Acta Ecologica Sinica. 33: 38-44.

Zhu, B. y Cheng, W. 2011. Rhizosphere priming effect increases the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition. Global Change Biology. 17: 2172-2183.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Effects of a *Leucaena leucocephala* leaf extract on xanthine oxidase activity and serum oxypurine levels in mice

Efectos de un extracto de hojas de *Leucaena leucocephala* en la actividad de xantina oxidasa y en los niveles séricos de oxipurinas en ratones

Flavio Martinez-Morales[1], Juan R. Zapata-Morales[2], Juan F. López-Rodríguez[3], Othir G. Galicia-Cruz[1], Mario A. Isiordia-Espinoza[4] and Othoniel H. Aragon-Martinez[1]*

[1] Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
[2] Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
[3] Bioterio, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
[4] Instituto de Investigación en Ciencias Médicas, Departamento de Clínicas, División de Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

ABSTRACT

There is a need for novel alternatives to the medical use of allopurinol. In this sense, the present study obtained a leaf extract from *L. leucocephala*, and its chemical composition, inhibitory action against xanthine oxidase (XO) *in vitro*, inhibitory interaction between the extract and allopurinol, and the inhibitory action on XO *in vivo* using mice treated with potassium oxonate and hypoxanthine, were determined. Polyphenol and flavonoid compounds were found in the leaf extract. For the leaf extract, the IC_{50} and maximal values were 334.60 µg/mL and 46.4 % for the inhibition of XO. The 3:1 ratio combination of allopurinol and extract showed IC_{50} and waDRI values of 1.35 µg/mL, 1.13 (allopurinol) and 1015.72 (extract) to inhibit XO, resulting in a synergistic interaction against XO *in vitro*. This combination also enhanced the therapeutic success in the mouse model compared with allopurinol administered alone. The present study presents the first evidence for the use of an allopurinol and *L. leucocephala* extract combination at a 3:1 ratio, as a substitute for the administration of allopurinol alone.

Keywords: allopurinol; Chou-Talalay theory; synergism; hypoxanthine

RESUMEN

Hay una necesidad de nuevas alternativas al uso medicinal de alopurinol. En este sentido, el presente estudio obtuvo un extracto de hojas de *L. leucocephala* al cual se le determinó su composición química, acción inhibitoria contra xantina oxidasa (XO) *in vitro*, interacción inhibitoria entre el extracto y alopurinol, y acción inhibitoria contra XO *in vivo* empleando ratones bajo administración de hipoxantina y oxonato de potasio. Compuestos polifenoles y flavonoides fueron detectados y cuantificados en el extracto de hojas. Para el extracto solo, su valor IC_{50} y máximo de inhibición contra XO fueron de 334.60 µg/mL y 46.4 %. La combinación a una proporción 3:1 de alopurinol y extracto obtuvo valores IC_{50} y waDRI de 1.35 µg/mL, 1.13 (alopurinol) y 1015.72 (extracto) para inhibir a XO, resultando en una interacción sinérgica contra XO *in vitro*. Donde esta misma combinación incrementó el éxito terapéutico en el modelo murino al compararse con la administración de alopurinol solo. Nuestro estudio presenta la primera evidencia para el uso de una combinación de alopurinol y extracto de *L. leucocephala* a una proporción 3:1 como un sustituto para la administración de alopurinol solo.

Palabras clave: alopurinol; teoría de Chou-Talalay; sinergismo; hipoxantina

INTRODUCTION

Uric acid (UA) is the end product of purine metabolism in humans. In the degradation pathway, xanthine oxidase (XO) transforms hypoxanthine to xanthine, which is then degraded into UA (Mehmood *et al*., 2020). The abnormal and excess accumulation of UA in the blood, known as hyperuricemia, is a risk factor for diabetes, cardiovascular complications, metabolic syndrome, and chronic kidney disease (Chen *et al*., 2019). Hyperuricemia can be caused by the overproduction or reduced excretion of UA (Mehmood *et al*., 2020; Kim *et al*., 2021a). Circulating UA is filtered by the glomeruli, and approximately 90 % of the filtered material is usually reabsorbed into the renal proximal tubules via transporter molecules (Oh *et al*., 2019; Kim *et al*., 2021a). As kidneys are responsible for approximately 70 % of daily UA excretion (Mehmood *et al*., 2020), XO and renal urate transporters are important targets for the regulation of hyperuricemia in patients (Oh *et al*., 2019).

Clinically, allopurinol is commonly used to inhibit XO activity and thus reduce serum UA levels (Chen *et al*., 2019; Oh *et al*., 2019). Depending on the concentration, allopurinol may cause serious side effects, such as a reaction involving eosinophilia and systemic symptoms, toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, allopurinol hypersensitivity syndrome, and gastrointestinal toxicity (Stamp and Barclay, 2018; Oh *et al*., 2019). Consequently, there is a clear need for novel therapies for regulating serum UA levels or, alternatively, the use of allopurinol at lower doses. Plant-derived extracts have potential use as effective and natural

*Author for correspondence: Othoniel H. Aragon-Martinez
e-mail: hugo.aragon@uaslp.mx
Received: September 14, 2023
Accepted: March 1, 2024
Published: April 8, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2155

antihyperuricemic therapies (Kim *et al*., 2021a). Combination studies are common methods for identifying synergy among drugs to facilitate the reduction of doses while maintaining a similar level of therapeutic efficacy to that obtained from the use of the drug on an individual basis (Martinez-Morales *et al*., 2022).

Leucaena leucocephala is a leguminous tree native to southern Mexico and northern Central America. Previous studies on the use of different parts of the tree have found antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties (Chung *et al*., 2017). To date, the effects of *L. leucocephala* extracts on *in vitro* XO activity or serum UA levels in either humans or animal models have not been evaluated, although quercetin, which is one of the major flavonoids found in the leaf extracts obtained from this plant, inhibits the generation of UA and the superoxide radicals catalyzed by XO *in vitro* (Xu *et al*., 2018). Moreover, to our knowledge, a combination approach has never been applied to a combination of *L. leucocephala* extract and allopurinol.

The present study aimed to identify the *in vitro* synergistic inhibitory action exerted on XO, by a mixture of allopurinol and *L. leucocephala* leaf extract and, subsequently, evaluate its effects on the serum levels of UA, xanthine and hypoxanthine in an experimental model of hyperuricemia recognized in mice (Liang *et al*., 2018).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The 2 N Folin-Ciocalteu reagent, allopurinol, quercetin, xanthine, hypoxanthine, XO, rutin, dimethyl sulfoxide (DMSO), carboxymethylcellulose (CMC), potassium oxonate, UA, ascorbic acid, gallic acid, and creatinine were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium carbonate, acetic acid, hydrochloric acid, disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, aluminum chloride, and potassium acetate were of reagent grade. Ethanol and acetonitrile were of liquid chromatography grade (Mallinckrodt Baker Inc., Mexico City, Mexico). Deionized water (MontRial, San Luis Potosi, Mexico) was used for the aqueous solutions.

Collection and preparation of plant material

L. leucocephala (Lam.) de Wit samples were collected from Santa María Tonameca, Oaxaca de Juárez, Mexico, in November 2019 and authenticated by Eleazar Carranza González, who is affiliated with the Herbarium Isidro Palacios of the Instituto de Investigación de Zonas Desérticas of the Universidad Autónoma de San Luis Potosi, with a voucher specimen then deposited in the herbarium. Subsequently, the leaf samples were air-dried without exposure to the sun. Two hundred eighty-two grams of the powdered leaf sample was macerated in 1 liter of ethanol:water 96:4 v/v at room temperature (22 °C) for 12 d. The resulting solution was filtered, and the solvent was removed under reduced pressure at 40 °C. Finally, the plant extract was stored at 0 °C and protected from exposure to light.

Identification and content of polyphenols and flavonoids in the extract

The total polyphenol content in leaf extracts was determined using a modified version of the Folin-Ciocalteu method (Musci and Yao, 2017), wherein 30 µL of leaf extract, representing 0.0112 mg dry weight, or gallic acid standard solution was mixed with 150 µL of Folin-Ciocalteu reagent diluted to 1:10 with deionized water. After 5 min at room temperature, 120 µL of a 10 % (w/v) sodium carbonate solution was added to the mixture and incubated at room temperature for 30 min. The mixture was then centrifuged at 3000 × g for 5 min at 10 °C, and 200 µL of the supernatant was placed into one well of a 96-well plate (Costar® 3595, Corning Incorporated, NY, USA), and the absorbance measured at 765 nm against a blank sample (ethanol). Polyphenol concentrations were obtained by interpolating the absorbance values of the extract samples into gallic acid calibration curves. Using the data of volume and grams of the extract used, the results are expressed as mg gallic acid equivalents/g of extract.

The total flavonoid content in extracts was quantified by a colorimetric technique (Farasat *et al*., 2014), wherein 40 µL of leaf extract, representing 0.0150 mg dry weight, or rutin standard solution were mixed with 40 µL of a 10 % (w/v) aluminum chloride solution, 40 µL of a 1 M potassium acetate solution, and 360 µL deionized water. After 30 min at room temperature, 200 µL of the mixture was placed into one well of a 96-well plate, and the absorbance was recorded at 415 nm against blanks (ethanol). Considering the data of interpolation into rutin calibration curves and volume and grams of the extract used, the flavonoid concentration is expressed as mg rutin equivalents/g of extract.

A liquid chromatographic (LC) analysis was performed as described previously (Seal, 2016; Cefali *et al*., 2019) for the identification of flavanols and flavones and the quantification of gallic acid, quercetin, and rutin in the extract samples. The analysis was optimized for quercetin and rutin, as these two flavonoids are described as the main compounds found in biologically relevant extracts obtained from natural sources (Cefali *et al*., 2019). For chromatographic separation, the column compartment was maintained at 24 °C, while the mobile phase consisted of 1 % acetic acid in an acetonitrile gradient. The separation and column regeneration conditions applied were 80 % mobile phase plus 20 % acetonitrile for 2 min, followed by a change to 10 % mobile phase and 90 % acetonitrile for 8 min and a second change to 80 % mobile phase plus 20 % acetonitrile for 5 min, with the final composition then maintained for 5 min. The analysis was performed using an injection volume of 20 µL of the sample dissolved in ethanol at a 1 mL/min rate, with monitoring conducted at 257 nm, a run time of 20 min, and drawing spectra of 200 to 400 nm. Gallic acid, rutin, and quercetin were identified by means of their retention times and spectra records, while their concentration in the plant extract was obtained by interpolating their responses into calibration curves performed for each pure compound, with the results expressed as µg compound/g of leaf extract. The other flavanols and flavones

were identified using the spectral data for their B-ring cinnamoyl and A-ring benzoyl systems, which are observed as two major UV absorption peaks (Band I and Band II) in this class of compounds (Mabry *et al*., 1970). The percentage abundance of flavanols and flavones in the extract was calculated using the area values of their peaks and all peaks eluted in the chromatogram.

Evaluation of the inhibitory effect on XO

The assay was performed following that set out by Nguyen *et al*. (2004), with some modifications. Stock solutions of XO (0.37 U/mL) and xanthine (1 mM) were prepared in 70 mM phosphate buffer solution (pH 7.5), while stock solutions of allopurinol (1.4 mg/mL), plant extract (9.5 mg/mL), and quercetin (6 mg/mL) were prepared in ethanol:DMSO 96:4 v/v. Quercetin was used as a positive control for the action of flavonoids against XO activity. Subsequently, working standards for allopurinol, quercetin, and plant extract were prepared using ethanol:water 1:1 v/v and ranged from 0.16 to 41.30, 1.20 to 153.75, and 4.07 to 1563.00 µg/mL, respectively (seven to nine points per sample, N= 5). For each preparation tested, the number of standards and the range of concentrations were established in accordance with the guidelines to accurately estimate the concentration level that was able to achieve a 50 % inhibition (IC_{50}) of XO activity (Sebaugh, 2011). The assay mixture comprised 100 µL of test solution, 70 µL of 70 mM phosphate buffer (pH 7.5), and 60 µL of XO stock solution. After preincubation at 37 °C for 30 min, the reaction was initiated by adding 120 µL xanthine stock solution, with the assay mixture then incubated again at 37 °C for 30 min, after which the reaction was stopped by adding 50 µL 1 N HCl. Two hundred microliters of each mixture were placed into a 96-well plate, and the absorbance was read at 290 nm.

A blank sample for each solution tested was prepared in the same way, with the enzyme solution added to the assay mixture after the addition of the 1 N HCl solution. Using the data obtained from the blank samples, the interference-free absorbance was calculated for each experimental sample. Then, the inhibitory effect on XO was expressed as the percentage of XO inhibition, which was calculated using the interference-free absorbance of the assay mixture, both with and without (0 µg/mL) the test material.

Interaction assessment of the XO inhibitors

For the samples tested, constant ratio combinations were performed (Chou, 2006; Chou, 2010). Once the IC_{50} value for each sample was obtained via the XO inhibition assay, the combination of allopurinol and plant extract was assessed via the same assay, using six different proportions. For the combinations of allopurinol and leaf extract, concentrations ranging from 0.65 to 20.82, 0.32 to 10.37, 0.66 to 21.29, 0.24 to 7.89, 0.44 to 14.27, and 0.75 to 24.13 µg/mL were used for the 1:3, 1:1, 3:1, 5:1, 10:1, and 30:1 combination, respectively (six points per combination, N= 5). Concentrations ranging from 0.65 to 20.92, 0.32 to 10.62, 0.35 to 11.18, 0.45 to 14.61, 0.42 to 13.42, and 0.28 to 8.94 µg/mL were used for the allopurinol and quercetin combinations at 1:3, 1:1, 3:1, 5:1, 10:1, and 30:1, respectively (six points per combination, N= 5).

Data obtained for the combinations were evaluated using the Chou-Talalay method, which is based on the median-effect equation, which, in turn, is derived from the mass-action law principle (Chou, 2006). The Chou-Talalay theory involves the quantitative definition of synergism, additivity, and antagonism by means of a combination index (CI) value and their visual definition by means of an isobologram (Chou, 2006). Furthermore, the theory includes a dose-reduction index (DRI), which measures decreasing dose folds of each drug (Chou, 2006).

A weighted average CI (waCI) value was calculated for each combination using the following formula: $waCI = [CI_{90} + (2 \times CI_{75}) + (3 \times CI_{50}) + (4 \times CI_{30})]/10$. This formula was designed to increase the relevance of low effect levels, as XO inhibitors should be used at a sufficiently low concentration to achieve the target serum urate level in gout patients (Chou, 2006; Stamp and Barclay, 2018; Checkmahomed *et al*., 2020). For synergistic or additive interactions only, a weighted average DRI (waDRI) value was determined for each component in the mixture using the formula $waDRI = [DRI_{90} + (2 \times DRI_{75}) + (3 \times DRI_{50}) + (4 \times DRI_{30})]/10$, with low effect levels also of high relevance for this formula.

Animals

Once the experiments described above had been completed and their results analyzed, the utility of the leaf extract and its combined use with allopurinol in the animal model was evaluated. All animal procedures were approved by the university's Institutional Animal Care and Use Committee (approval number: BGFMUASLP-06-19) and conducted in full compliance with international guidelines (National Research Council US, 2011). Male BALB/c mice (16 - 20 g) were kept under standard laboratory conditions (room temperature 21 ± 1 °C with a 12 h dark and light schedule) and housed in acrylic cages with free access to water and a standard diet. All mice were housed under laboratory conditions for one week before the experiment.

Drug administration and animal model

Hyperuricemia was induced via potassium oxonate (uricase inhibitor) and hypoxanthine, in accordance with Lemos Lima *et al*. (2015) and Yong *et al*. (2016), with some modifications. Hypoxanthine, allopurinol, and leaf extract were suspended in 0.3 % CMC aqueous solution, while potassium oxonate was suspended in 0.5 % CMC aqueous solution. The mice were randomly divided into six experimental groups (N = 5 for each group) and subjected to fasting 2 h prior to the injection of the uricase inhibitor. The inhibitor (280 mg/kg bw, i.p.) was administered once daily to the animals from Groups 2 - 6 for three consecutive days. Vehicle (8.0 mL/kg bw), allopurinol at 2.5 mg/kg bw, leaf extract (729.2 mg/kg bw), allopurinol-extract combination at a ratio of 3:1 (2.2 mg/kg bw allopurinol plus 0.7 mg/kg bw extract), or allopurinol at 2.2 mg/kg bw were administered ten minutes after the

application of the inhibitor via gavage once a day for three days to the animals of Groups 2, 3, 4, 5, and 6, respectively.

One hour after the potassium oxonate injection, the hypoxanthine suspension was administered by gavage to the mice in Groups 2 - 6 (268.0 mg/kg bw). Group 1 was administered the vehicle via intraperitoneal and oral routes (8 mL/kg bw) for the same periods of time as the other groups. The allopurinol dose (2.5 mg/kg, Group 3) was selected to produce a uric acid level close to that found in the animals administered the vehicle (Group 1), while the doses of the extract alone (Group 4) or combined with allopurinol (Group 5) were determined on the basis of their IC_{50} values and *in vitro* interaction studies. Group 6 was administered the dose of allopurinol used in the foregoing combination but applied without extract. The oral administration of allopurinol and leaf extract was selected, as it is the most preferred route of administration in patients with hyperuricemia.

On the third day, one hour after hypoxanthine administration, mice were anesthetized with a combination of ketamine and xylazine (100 and 20 mg/kg bw, respectively), and their blood was then collected by means of cardiac puncture. Each blood sample was kept at 4 °C for 1 h and then centrifuged at 3000 × g for 10 min at 4 °C. The resultant serum samples were separated and frozen at -70 °C for further analysis.

Determination of serum UA, xanthine, hypoxanthine, and creatinine levels

LC analysis was performed as described previously (Tsikas *et al*., 2004; Pleskacova *et al*., 2017) with some modifications. For chromatographic separation, the column compartment was maintained at 32 °C, while the mobile phase consisted of a phosphate buffer solution (100 mmol/L potassium dihydrogen phosphate at pH 6.0) in an acetonitrile gradient. Separation and subsequent column regeneration conditions applied were 100 % phosphate buffer solution for 4 min, followed by a change to 70% phosphate buffer solution and 30 % acetonitrile for 30 s, with this composition then maintained for 2 min, followed by a second change to 100 % phosphate buffer solution for 30 s, with, finally, this composition then maintained for 3 min. The analysis was performed with an injection sample volume of 20 µL and a flow rate of 1 mL/min, wherein monitoring was conducted at 236, 248, 263, and 292 nm for creatinine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid, respectively, with a run time of 10 min and drawing spectra of 200 to 400 nm. Each compound was identified by retention time and spectrum record, their concentration in the serum samples was obtained by interpolating their response into calibration curves performed with the pure compounds. The results were expressed as µmol of compound/L of serum sample.

Absorbance and chromatographic measurement

A Cytation™ 3 microplate reader controlled by Gen5™ software (Biotek Instruments Inc., Vermont, USA) was used for the absorbance measurements. A 1100 series Agilent LC system consisting of a quaternary pump with degasser, a standard autosampler, a thermostatted column compartment, and a diode array detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for the LC analyses. Agilent ChemStation software for LC 3D systems was used for data collection, integration, and evaluation of the spectra records. The chromatographic separations described above were carried out using a 150 mm long AcclaimTM 120 C18 column with a 5 µm particle size and a 4.6 mm internal diameter (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Data analysis

For the combination analyses, the waCI value was interpreted as described previously (Chou, 2006). If the data points fell on the isobologram hypotenuse, an additive effect was determined, while if the data points fell on the lower or upper left of the hypotenuse, synergism or antagonism was determined, respectively (Chou, 2006). A waDRI of > 1 indicated a more favorable dose reduction for the combination applied than that achieved using each compound alone (Chou, 2006). Additionally, the conformity of the data with the mass-action law was evaluated using the linear correlation coefficient (r) of the median-effect plot, where an r value close to 0.9 was considered an acceptable value (Martinez-Morales *et al*., 2022). The IC_{50} values, combination analyses, and isobolograms were conducted using Compusyn software (ComboSyn Inc, NJ, USA).

The IC_{50} values, maximal inhibitory effects (MIE), and serum oxypurine and creatinine levels are presented as the mean or mean plus standard deviation. These results were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's posttest, which was performed using GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Chemical composition of the leaf extract

Table 1 shows the identification and quantification of the *L. leucocephala* leaf extract components. Rutin and quercetin comprised 7.39 % and 0.77 % of the total flavonoids, respectively, while the phenolic compound gallic acid was abundant in the leaf extract, and a nonidentified compound (Peak 1)

Table 1. Chemical profile of the leaf extract.
Tabla 1. Perfil químico del extracto de hojas.

Compound	Content in the extract
Total polyphenols	202.05 ± 21.89 mg GAE/ g extract
Total flavonoids	127.17 ± 24.62 mg RE/ g extract
Rutin	9397.4 ± 536.8 µg/ g extract
Quercetin	975.6 ± 79.5 µg/ g extract
Gallic acid	40922.0 ± 2189.6 µg/ g extract
Other flavones or flavanols	43.38 ± 0.82% of eluted peaks
Nonidentified compounds	17.60 ± 0.84% of eluted peaks

Every value includes the mean ± standard deviation (N = 5). GAE, gallic acid equivalents; RE, rutin equivalents.

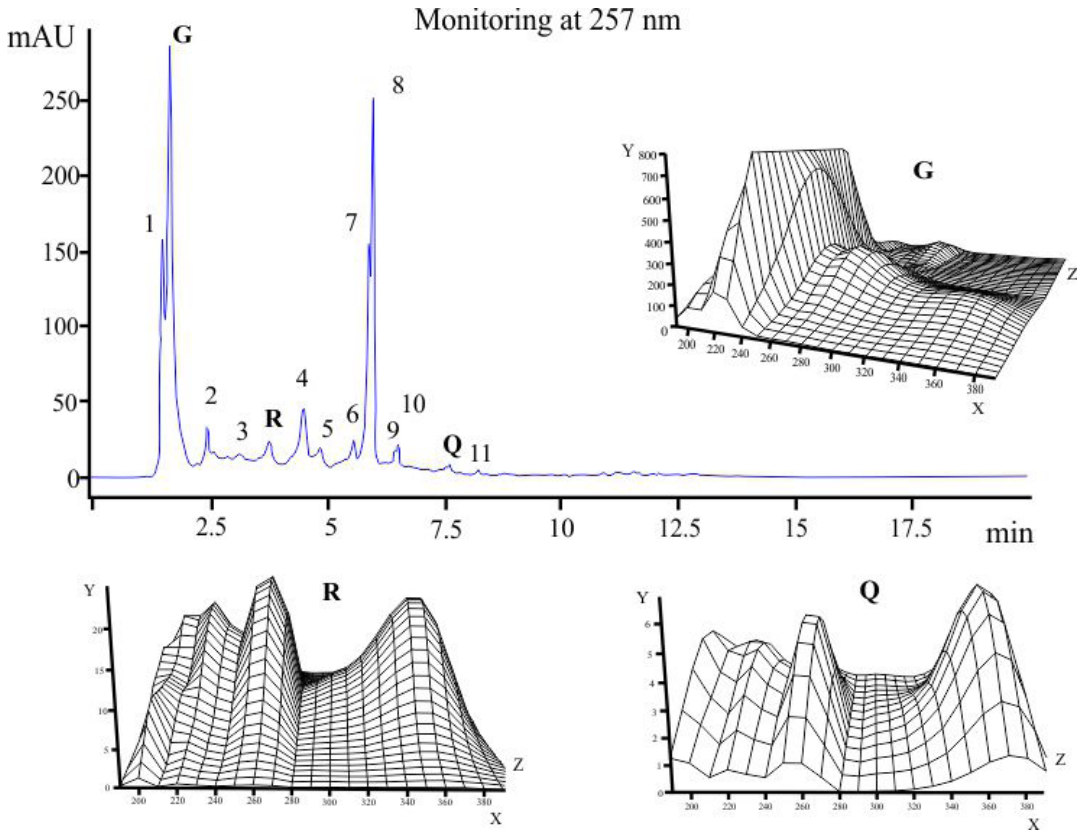


Figure 1. Representative chromatogram and spectra records for the compounds (G, Q, R, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11) eluted from an *L. leucocephala* leaf extract. The absorbance (mAU) on the Y-axis, the wavelength (nm) on the X-axis, and the time (min) on the Z-axis are plotted in each 3D spectrogram. G, gallic acid; R, rutin; Q, quercetin.
Figura 1. Cromatograma y espectrograma representativos de los compuestos eluidos del extracto de hojas de *L. leucocephala*. La absorbancia (mAU) en el eje Y, la longitud de onda (nm) en el eje X y el tiempo (min) en el eje Z son trazados en cada espectrograma 3D. G, ácido gálico; R, rutina; Q, quercetina.

coeluted with it (Fig. 1). Gallic acid, rutin, and quercetin in the extract presented wavelength absorption maxima (λmax) values of 270, 260/350, and 250/370 nm, respectively (Fig. 1). Compounds (peaks) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11 were detected in extracts and exhibited λmax values at 270, 230, 270, 260/350, 260/350, 260/350, 260/350, 260/350, 260/350, 260/340, and 270/330 nm, respectively. Similar to quercetin and rutin, compounds 4 - 11 presented flavanol and flavone bands I and II. Retention times and spectra records for gallic acid, rutin, and quercetin in extracts coincided with those used as standards.

Activity of XO inhibitors and their combinations *in vitro*

Table 2 shows our IC_{50}, MIE, r, waCI and waDRI values for leaf extract and compounds, as well as the interpretation of possible interactions. Isobolograms confirmed interactions between different allopurinol combinations with either quercetin or leaf extract (Fig. 2).

Effects of allopurinol, leaf extract, and the allopurinol and leaf extract combination in mice

UA and creatinine serum values remained unchanged in all tested groups. Mice in Groups 3, 5, and 6 presented high hypoxanthine and xanthine serum levels, in contrast with mice in Groups 1, 2, and 4. In terms of serum hypoxanthine levels, leaf extract administration to Group 5 modified the P value in contrast to Group 6, although both groups received the same dose of allopurinol (Fig. 3).

Mouse serum chromatographic analysis revealed peaks with λ_{max} values of 230, 250, 270, and 290 nm, which matched those of creatinine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid standards, respectively (Fig. 4).

DISCUSSION

The present study shows, for the first time, that a 3:1 combination of allopurinol and *L. leucocephala* leaf extract (equivalent to 2.2: 0.7 mg/kg dose) administered to hyperuricemia-induced mice exerted a similar inhibitory effect on the XO enzyme and increased the probability of therapeutic success to that produced by allopurinol administered alone (2.5 or 2.2 mg/kg). This combination enabled significant lowering of the individual doses of both allopurinol and leaf extract required to achieve similar effects. Such effects, which were markedly noticed in the extracts, also displayed synergistic action against XO. On the other hand, leaf extract alone (729.2 mg/kg) did not achieve any inhibitory effect on XO, coinciding with observations in the *in vitro* experiments.

L. leucocephala leaf extracts possess a great diversity of bioactive compounds, such as tannins, vitamin E, ascorbic acid, carotenes, xanthophylls, alkaloids, and phenolics,

Table 2. Results obtained from the extract, pure compounds, and their combinations in the XO inhibition assay.
Tabla 2. Resultados obtenidos del extracto, compuestos puros y sus combinaciones en el ensayo de la inhibición de XO.

Sample	IC_{50} value	r value	MIE value (%)	waCI value	Type of interaction	waDRI (A / H or Q)
A	1.14	0.9661	97.8	na	na	na
H	334.60*	0.8040	46.4*	na	na	na
Q	11.80*	0.8488	40.9*	na	na	na
AH 1:3	5.42	0.9937	na	1.19	Slight antagonism	na
AH 1:1	2.39	0.9887	na	1.04	Nearly additive	0.97 / 301.69
AH 3:1	1.35	0.9609	na	0.89	Slight synergism	1.13 / 1015.72
AH 5:1	1.26	0.9836	na	0.92	Nearly additive	1.08 / 1643.50
AH 10:1	1.47	0.9538	na	1.17	Slight antagonism	na
AH 30:1	1.45	0.8958	na	1.11	Slight antagonism	na
AQ 1:3	47.35	0.8721	na	17.43	Very strong antagonism	na
AQ 1:1	12.54	0.9774	na	9.63	Strong antagonism	na
AQ 3:1	3.17	0.9809	na	3.55	Strong antagonism	na
AQ 5:1	1.90	0.9857	na	1.46	Antagonism	na
AQ 10:1	1.27	0.9905	na	1.03	Nearly additive	0.98 / 104.29
AQ 30:1	1.26	0.9900	na	1.07	Nearly additive	0.93 / 293.34

Every value includes the mean (N = 5). *P value of < 0.0001 versus A. A, allopurinol; H, leaf extract; MIE, maximal inhibitory effect; na, not applicable; Q, quercetin.

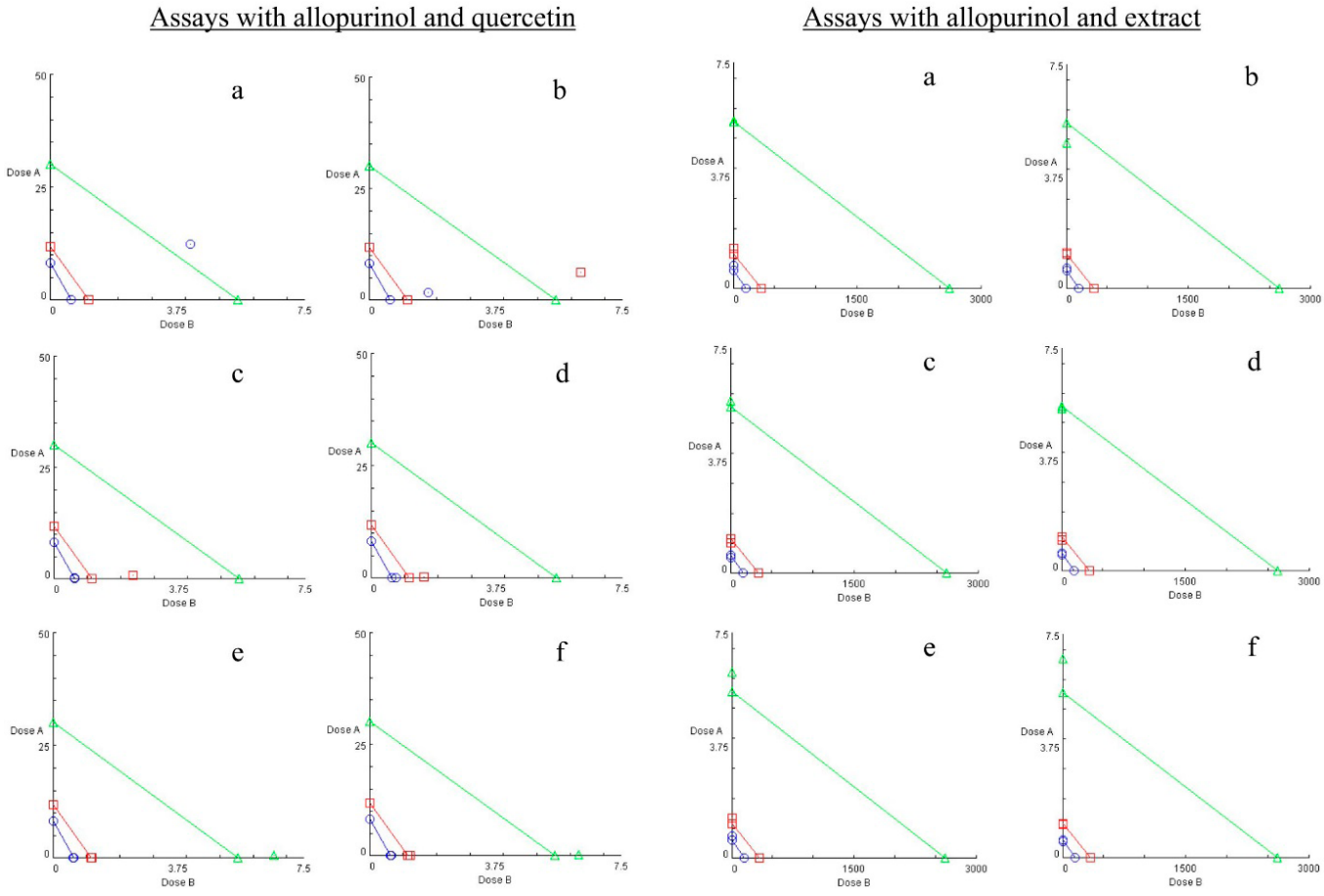


Figure 2. Isobolograms for the 30% (blue), 50% (red), and 90% (green) levels of XO inhibition induced by the 1:3 (a), 1:1 (b), 3:1 (c), 5:1 (d), 10:1 (e), and 30:1 (f) combinations of allopurinol and quercetin or leaf extract. For the assays with allopurinol and quercetin: A, quercetin; B, allopurinol. For the assays with allopurinol and extract: A, allopurinol; B, leaf extract.
Figura 2. Isobologramas de la inhibición al nivel del 30%, 50% y 90% de XO inducida por las combinaciones 1:3 (a), 1:1 (b), 3:1 (c), 5:1 (d), 10:1 (e), and 30:1 (f) de alopurinol con quercetina o extracto de hojas. Para los ensayos con alopurinol y quercetina: A, quercetina; B, alopurinol. Para los ensayos con alopurinol y extracto: A, alopurinol; B, extracto.

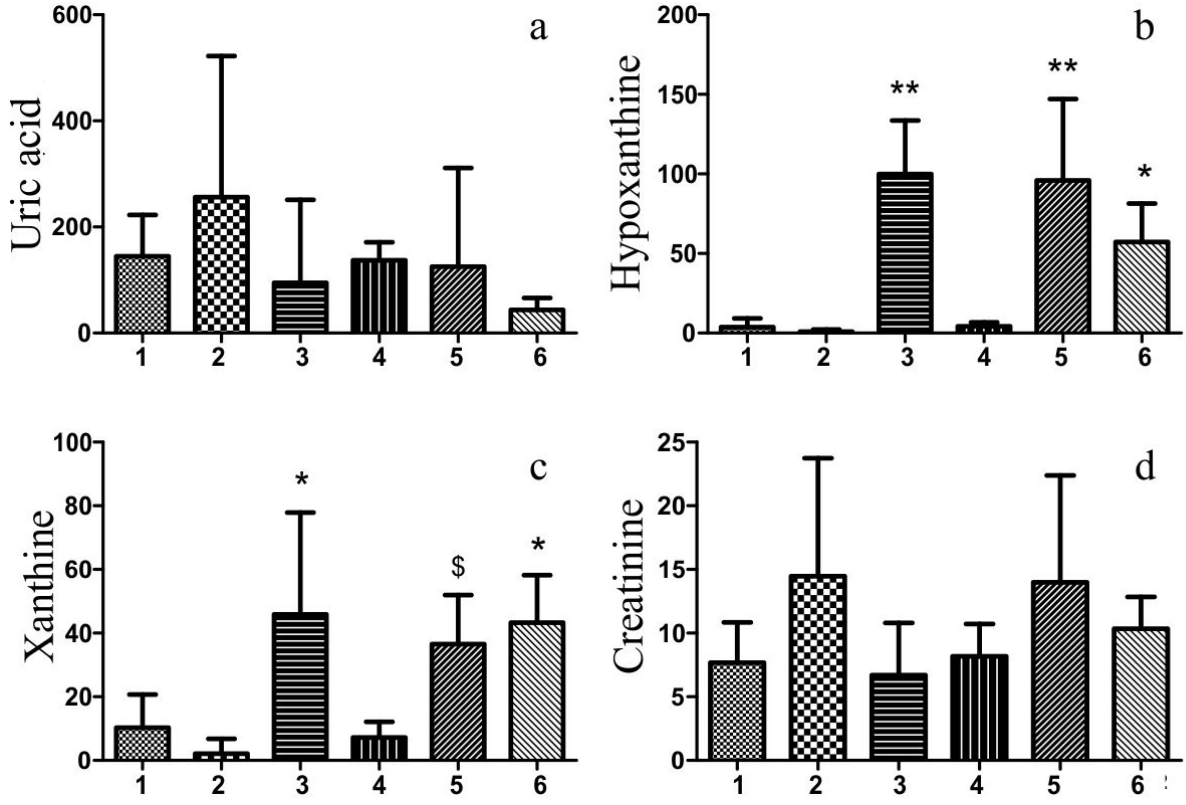


Figure 3. Serum levels (µmol/L) of uric acid (a), hypoxanthine (b), xanthine (c), and creatinine (d) in mice in groups 1, 2, 3, 4, 5, and 6. **P value of < 0.0001 versus groups 1, 2, and 4; *P value of < 0.05 versus groups 1 and 2 in graph b. *P value of < 0.05 versus groups 1, 2, and 4; and $P value of < 0.05 versus group 2 in graph c.

Figura 3. Niveles séricos (µmol/L) de ácido úrico (a), hipoxantina (b), xantina (c) y creatinina (d) en los ratones de los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. **Valor P de < 0.0001 comparado con los grupos 1, 2 y 4; *Valor P de < 0.05 comparado con los grupos 1 y 2 en el gráfico b. *Valor P de < 0.05 comparado con los grupos 1, 2 y 4; $Valor P de < 0.05 comparado con el grupo 2 en el gráfico c.

mainly flavonoids (Chew *et al*., 2011; Xu *et al*., 2018). Flavonoid glycosides conjugated to either arabinose and rhamnose or glucuronide, galactose, and glucose have been isolated from *L. leucocephala* leaves, with quercetin, quercetin-3-O-α-rhamnopyranoside, and myricetin-3-O-α-rhamnopyranoside described as the major flavonoids (Xu *et al*., 2018). Other flavonoids present in low quantities include quercetin-3-O-α-arabinofuranose, naringenin, geraldone, 7,3′-dihydroxy-4′-methoxyflavone, apigenin, chrysoeriol, diosmetin, kaempferol, luteolin, 3′,4′,7-trihydroxyflavone, juglanin, kaempferol-3-O-α-rhamnopyranoside, (+) taxifolin, and myricetin (Xu *et al*., 2018). Coinciding with the foregoing, analysis of the *L. leucocephala* leaf extract administered in the present study showed that it contains polyphenol compounds, a large proportion of which were flavonoids, with quercetin in low quantities, while a substantial percentage of other flavones or flavanols were also identified (Table 1 and Fig. 1).

For the first time, the present study reported the presence of gallic acid and rutin in an *L. leucocephala* leaf extract. The differences in the chemical composition and abundance of compounds in extracts obtained from the same plant species, may be due to its adaptation to the ecological environment and the extraction method used, among other factors (Cui *et al*., 2015; Córdova-Guerrero *et al*., 2016). Other compounds that can be measured with the chromatographic method, such as ascorbic acid (λ_{max} = 250 nm), catechin (λ_{max}= 279 nm), methyl gallate (λ_{max}= 275 nm), caffeic acid (λ_{max}= 327, 295, 243, and 217 nm), syringic acid (λ_{max}= 217 nm), p-coumaric acid (λ_{max}= 285/305 nm), sinapic acid (λ_{max}= 303 or 311 nm), ferulic acid (λ_{max}= 285/300 nm), myricetin (λ_{max}= 255/375), apigenin (λ_{max}= 269/340 nm), and kaempferol (λ_{max}= 268/369 nm) were not detected in our extracts (Barthelmebs *et al*., 2000; Galano *et al*., 2011; Li *et al*., 2016; Tosovic, 2017; Zhang *et al*., 2018; Kim *et al*., 2021b).

The *L. leucocephala* leaf extract presented a lower efficiency and potency in inhibiting the XO enzyme than allopurinol (Table 2). This finding cannot be compared with previous studies, as, to our knowledge, the present study is the first report on such effects. However, in line with our findings, the pure flavonoid rutin exhibited a higher IC_{50} value than allopurinol during *in vitro* XO inhibition assays (Malik *et al*., 2019). *In vitro* evaluations also found that quercetin was equally or less efficient in inhibiting XO activity compared to leaf extract and allopurinol, respectively, displaying an intermediate potency compared to that observed between leaf extract and allopurinol (Table 2). The literature reports contradictory results for the *in vitro* effects of quercetin against the XO enzyme, including reports of either a greater or

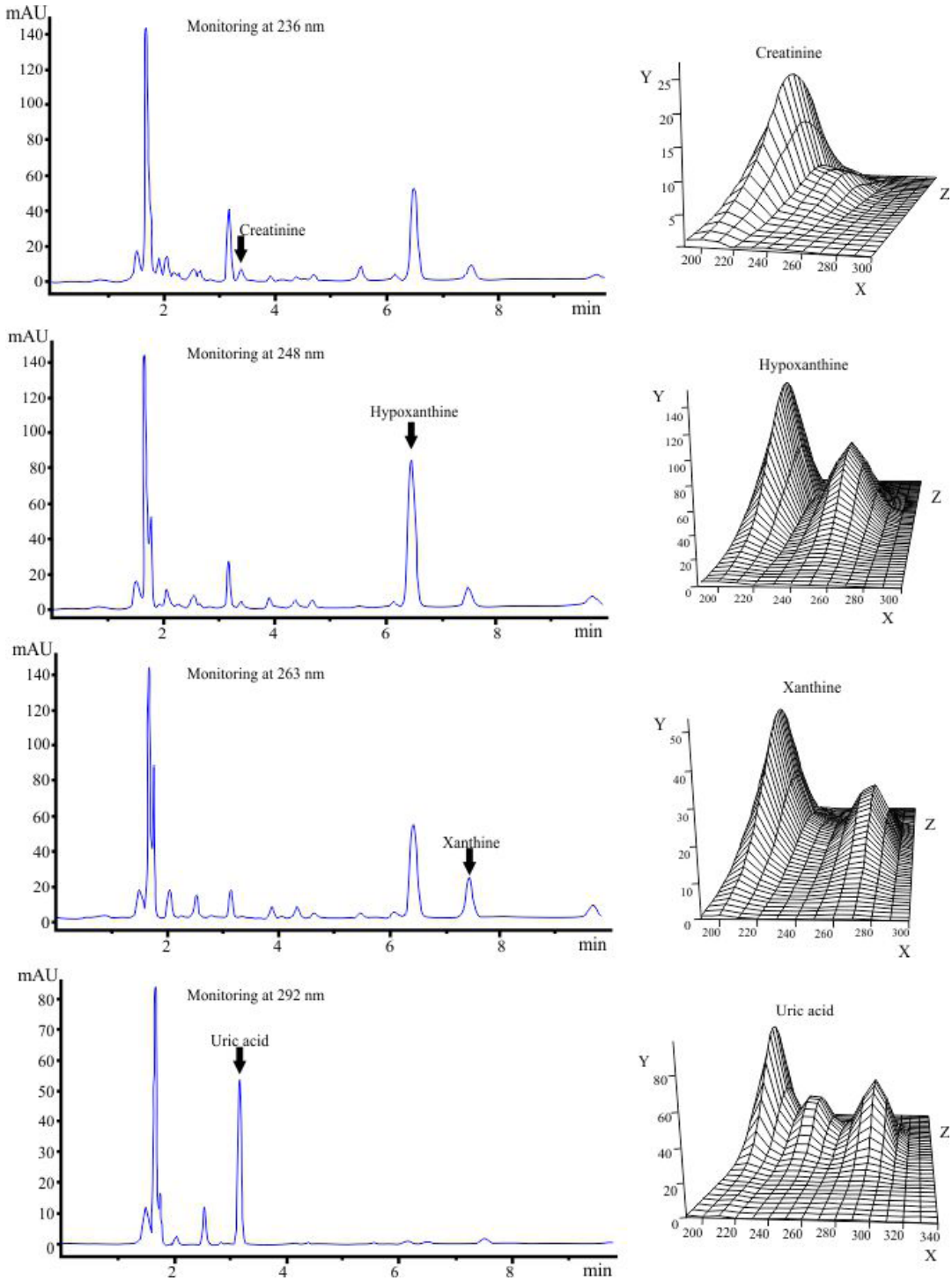


Figure 4. Representative chromatograms obtained from a serum sample of mice pertaining to the group administered with oxonate, allopurinol, leaf extract, and hypoxanthine. Furthermore, the spectrum record for each peak is shown. The absorbance (mAU) represented on the Y-axis, the wavelength (nm) represented on the X-axis, and the time (min) represented on the Z-axis are plotted in each 3D spectrogram.

Figura 4. Cromatogramas representativos obtenidos de una muestra sérica de ratón perteneciente al grupo con administración de oxonato, alopurinol, extracto de hojas e hipoxantina. Además, El espectro de cada pico es mostrado. La absorbancia (mAU) en el eje Y, la longitud de onda (nm) en el eje X y el tiempo (min) en el eje Z son trazados en cada espectrograma 3D.

lesser inhibition of XO than that achieved with allopurinol (Mohos *et al*., 2019).

To our knowledge, there are no previous reports of a combination study using allopurinol with *L. leucocephala* leaf extract and either pure rutin or quercetin. As observed in Table 2 and the isobolograms presented in Fig. 2, only the combination of allopurinol and leaf extract in a 3:1 ratio presented a slight synergistic interaction, as defined by the waCI value, which was observed at three of the four levels of effect tested (75, 50, and 30 %, with the exception of 90 %). This interaction was determined using the Chou-Talalay method, presenting an acceptable conformity with the theory applied. The synergistic interaction of the 3:1 ratio combination enabled a respective minor and major reduction of the allopurinol and extract doses required (waDRI > 1). Other allopurinol and extract combinations presented a nearly additive or slight antagonism, wherein both types of interactions did not perform better than the synergistic interaction observed, a finding supported by the IC50, waCI, and waDRI values. Consequently, the 3:1 combination of allopurinol and leaf extract was selected to be administered in mice. Moreover, the allopurinol and pure quercetin combinations did not present superior performance to, or any advantage over, the allopurinol and leaf extract combination.

The administration of potassium oxonate in BALB/c mice did not result in a significantly high level of serum UA by Day 3 (Fig. 3). This situation was produced by the different urate excretion by kidneys of the present strain rodent, compared to the mice used in the original study and by the low absorption of potassium oxonate from the peritoneal fluid into the systemic blood circulation (Bobulescu and Moe, 2012; Lemos Lima *et al*., 2015; Wishart *et al*., 2018; Al Shoyaib *et al*., 2020).

The administration of an oral hypoxanthine load in animals (268 mg/kg) subjected to potassium oxonate injection, allied to the use of the LC measurement of oxypurines in serum samples (Fig. 4), enabled the adequate interpretation of XO inhibition *in vivo*. The measurement of compounds involved in the purine catabolism pathway is desirable to effectively interpret UA generation (Aragon-Martinez *et al*., 2014). In the present study, the hypoxanthine dose administered was lower than the doses administered previously in mouse models (500 to 600 mg/kg) in studies that also applied the coadministration of potassium oxonate (Yong *et al*., 2016; Liang *et al*., 2018; Yong *et al*., 2018). The administered dose was limited by the saturation of the hypoxanthine suspension and the volume of administration, as it was close to the maximum volume considered good practice in mouse models (Diehl *et al*., 2001). We applied the XO inhibitor before the hypoxanthine load to enable the action of the inhibitor against the enzyme, which is the inverse of the administration regime applied in previous reports (Yong *et al*., 2016; Liang *et al*., 2018; Yong *et al*., 2018). As observed in Fig. 3, the administration of allopurinol partially inhibited the conversion of the hypoxanthine load to xanthine, and completely inhibited the degradation of the resulting xanthine into UA in mice (Zhang *et al*., 2021). It is important to note that there was a basal presence of serum UA in all the mouse groups tested, including the allopurinol group, as we selected an allopurinol dose that did not cause hypouricemia, a disorder associated with several inflammatory and degenerative diseases, as well as an increased risk of declining kidney function via a reduced renal antioxidant capacity (Park *et al*., 2020).

The activity found for the combined therapy can be explained by the synergistic interaction of allopurinol with the components found in the extract, an interaction determined in our *in vitro* studies (Table 2). Moreover, the application of this interaction strengthened the evidence for the change observed in the serum hypoxanthine levels of mice, under the administration of the allopurinol and leaf extract combination compared with allopurinol alone (2.2 mg/kg) (Fig. 3). Due to the link between the P value and the Type I error, the combination of *L. leucocephala* extract and allopurinol reduced the probability of treatment failure from 28.9, which corresponds to the administration of allopurinol alone, to < 1.8 % (Gao, 2020). It is clear that the present reduction in the allopurinol dose, does not have clinical relevance, but the improved probability of therapeutic success by the use of the combination has a very important impact in real clinical settings.

Finally, the inefficacy of the *in vivo* use of the extract alone is a consequence of its limited efficiency and potency in inhibiting XO, which was observed in our *in vitro* experiments (Table 2). The present study evaluated the interactions between a drug and a natural extract, to ascertain the possibility of reducing the dose required of the drug while continuing to inhibit XO both *in vitro* and *in vivo*. We employed the Chou-Talalay method for drug combination analyses, since it has physical-chemical bearings, mathematically verifiable equations, and theories. However, there are numerous models, approaches, hypotheses, and theories that can be used instead of the current experimental design (Chou, 2006), and therefore different outcomes can be obtained. It is clear that further studies are required to obtain additional evidence to support our study, including long-term preclinical and clinical studies. The present study represents a new development for the use of synergistic combinations to inhibit XO, an important target for regulating hyperuricemia in patients.

CONCLUSIONS

For the first time, the present study has shown that the use of an allopurinol and *L. leucocephala* leaf extract combination at a 3:1 ratio, was an effective and simple method for inhibiting XO *in vivo*, due to the synergistic interaction with an inhibitory effect on XO that is produced between the allopurinol and the compounds found in the extract. This combination produced a minor reduction in the allopurinol dose alongside an important increase in therapeutic success. Nevertheless, further studies are required to obtain data in support of the use of the allopurinol and *L. leucocephala* extract combination in a clinical setting.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was financially supported by the economic support provided to researchers by the SNI-CONAHCYT. The

authors thank Marco M. González-Chávez for their technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Al Shoyaib, A., Archie, S. R. and Karamyan, V. T. 2019. Intraperitoneal route of drug administration: Should it be used in experimental animal studies? Pharmaceutical Research. 37: 12. https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x

Aragon-Martinez, O. H., Galicia, O., Isiordia-Espinoza, M. A. and Martinez-Morales, F. 2014. A novel method for measuring the ATP-related compounds in human erythrocytes. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 233: 205-214. https://doi.org/10.1620/tjem.233.205

Barthelmebs, L., Divies, C. and Cavin, J. F. 2000. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from Lactobacillus plantarum reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3368-3375. https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3368-3375.2000

Bobulescu, I. A. and Moe, O. W. 2012. Renal transport of uric acid: evolving concepts and uncertainties. Advances in Chronic Kidney Disease. 19: 358-371. https://doi.org/10.1053/j.ackd.2012.07.009

Cefali, L. C., Ataide, J. A., Fernandes, A. R., Sanchez-Lopez, E., Sousa, I. M. O., Figueiredo, M. C., Ruiz, A. L. T. G., Foglio, M. A., Mazzola, P. G. and Souto, E. B. 2019. Evaluation of in vitro solar protection factor (SPF), antioxidant activity, and cell viability of mixed vegetable extracts from *Dirmophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinífera* L. Plants (Basel). 8: 453. https://doi.org/10.3390/plants8110453

Checkmahomed, L., Padey, B., Pizzorno, A., Terrier, O., Rosa-Calatrava, M., Abed, Y., Baz, M. and Boivin, G. 2020. In vitro combinations of baloxavir acid and other inhibitors against seasonal influenza A viruses. Viruses. 12: 1139. https://doi.org/10.3390/v12101139

Chen, Y., Li, C., Duan, S., Yuan, X., Liang, J. and Hou, S. 2019. Curcumin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 118: 109195. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109195

Chew, Y. L., Chan, E. W., Tan, P. L., Lim, Y. Y., Stanslas, J. and Goh, J. K. 2011. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. BMC Complementary Medicine and Therapies. 11: 12. https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-12

Chou, T. C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Research. 70: 440-446. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947

Chou, T. C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological Reviews. 58: 621-681. https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10

Chung, H. H., Chen, M. K., Chang, Y. C., Yang, S. F., Lin, C. C. and Lin, C. W. 2017. Inhibitory effects of *Leucaena leucocephala* on the metastasis and invasion of human oral cancer cells. Environmental Toxicology. 32: 1765-1774. https://doi.org/10.1002/tox.22399

Córdova-Guerrero, I., Aragon-Martinez, O. H., Díaz-Rubio, L., Franco-Cabrera, S., Serafín-Higuera, N. A., Pozos-Guillén, A., Soto-Castro, T. A., Martinez-Morales, F. and Isiordia-Espinoza, M. 2016. Antibacterial and antifungal activity of *Salvia apiana* against clinically important microorganisms. Revista Argentina de Microbiología. 48: 217-221. https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.007

Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C. and Lin, L. 2015. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. Botanical Studies. 56: 16. https://doi.org/10.1186/s40529-015-0096-4

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C. and European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology. 21: 15-23. https://doi.org/10.1002/jat.727

Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. and Namjooyan, F. 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 13: 163-170.

Galano, A., Francisco-Márquez, M. and Alvarez-Idaboy, J. R. 2011. Mechanism and kinetics studies on the antioxidant activity of sinapinic acid. Physical Chemistry Chemical Physics. 13: 11199-11205. https://doi.org/10.1039/c1cp20722a

Gao, J. 2020. P-values - a chronic conundrum. BMC Medical Research Methodology. 20: 167. https://doi.org/10.1186/s12874-020-01051-6

Kim, O. K., Yun, J. M., Lee, M., Kim, D. and Lee, J. 2021. Hypouricemic effects of *Chrysanthemum indicum* L. and *Cornus officinalis* on hyperuricemia-induced HepG2 Cells, Renal Cells, and Mice. Plants (Basel). 10: 1668. https://doi.org/10.3390/plants10081668

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. and Bolton, E. E. 2021. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. Nucleic Acids Research. 49: D1388-D1395. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971

Lemos Lima, R. de C., Ferrari, F. C., de Souza, M. R., de Sá Pereira, B. M., de Paula, C. A. and Saúde-Guimarães, D. A. 2015. Effects of extracts of leaves from *Sparattosperma leucanthum* on hyperuricemia and gouty arthritis. Journal of Ethnopharmacology. 161: 194-199. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.051

Liang, D., Yong, T., Chen, S., Xie, Y., Chen, D., Zhou, X., Li, D., Li, M., Su, L. and Zuo, D. 2018. Hypouricemic effect of 2,5-dihydroxyacetophenone, a computational screened bioactive compound from Ganoderma applanatum, on hyperuricemic mice. International Journal of Molecular Sciences. 19: 1394. https://doi.org/10.3390/ijms19051394

Li, B., Zhang, W. and Ma, H. 2016. Physicochemical characterization of inclusion complex of catechin and glucosyl-β-cyclodextrin. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 15: 167-172. http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i1.23

Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. 1970. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. En The Systematic Identification of Flavonoids. T.J. Mabry, K.R. Markham y M.B. Thomas (ed.), pp. 41-164. Springer, Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0_5

Malik, N., Dhiman, P. and Khatkar, A. 2019. In silico design and synthesis of targeted rutin derivatives as xanthine oxidase inhibitors. BMC Chemistry. 13: 71. https://doi.org/10.1186/s13065-019-0585-8

Martinez-Morales, F., Zapata-Morales, J. R. and Aragon-Martinez, O. H. 2022. Evaluation of the antioxidant interaction between butylated hydroxytoluene and quercetin and their utility for beef patties preservation. Biotecnia. 24: 69-78. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i1.1546

Mehmood, A., Zhao, L., Ishaq, M., Xin, W., Zhao, L., Wang, C., Hossen, I., Zhang, H., Lian, Y. and Xu, M. 2020. Anti-hyperuricemic potential of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) residue extract in hyperuricemic mice. Food & Function. 11: 6387-6406. https://doi.org/10.1039/c9fo02246e

Mohos, V., Pánovics, A., Fliszár-Nyúl, E., Schilli, G., Hetényi, C., Mladěnka, P., Needs, P. W., Kroon, P. A., Pethő, G. and Poór, M. 2019. Inhibitory effects of quercetin and its human and microbial metabolites on xanthine oxidase enzyme. International Journal of Molecular Sciences. 20: 2681. https://doi.org/10.3390/ijms20112681

Musci, M. and Yao, S. 2017. Optimization and validation of Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 68: 913-918. https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1311844

National Research Council US. 2011. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals, guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press (US). Washington, D.C.

Nguyen, M. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H. and Kadota, S. 2004. Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27: 1414-1421. https://doi.org/10.1248/bpb.27.1414

Oh, D. R., Kim, J. R., Choi, C. Y., Choi, C. H., Na, C. S., Kang, B. Y., Kim, S. J. and Kim, Y. R. 2019. Effects of chondroT on potassium oxonate-induced hyperuricemic mice: downregulation of xanthine oxidase and urate transporter 1. BMC Complementary Medicine and Therapies. 19: 10. https://doi.org/10.1186/s12906-018-2415-2

Park, J. H., Jo, Y. I. and Lee, J. H. 2020. Renal effects of uric acid: hyperuricemia and hypouricemia. The Korean Journal of Internal Medicine. 35: 1291-1304. https://doi.org/10.3904/kjim.2020.410

Pleskacova, A., Brejcha, S., Pacal, L., Kankova, K. and Tomandl, J. 2017. Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human plasma and serum by HPLC–UV: uric acid metabolism tracking. Chromatographia. 80: 529-536. https://doi.org/10.1007/s10337-016-3208-8

Seal, T. 2016. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 6: 157-166. https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60225

Sebaugh, J. L. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Pharmaceutical Statistics. 10: 128-134. https://doi.org/10.1002/pst.426

Stamp, L. K. and Barclay, M. L. 2018. How to prevent allopurinol hypersensitivity reactions? Rheumatology (Oxford). 57: i35-i41. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex422

Tosovic, J. 2017. Spectroscopic features of caffeic acid: theoretical study. Kragujevac Journal of Science. 39: 99-108. https://doi.org/10.5937/KgJSci1739099T

Tsikas, D., Wolf, A. and Frölich, J. C. 2004. Simplified HPLC method for urinary and circulating creatinine. Clinical Chemistry. 50: 201-203. https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.024141

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C. and Wilson, M. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. Nucleic Acids Research. 46: D1074-D1082. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037

Xu, Y., Tao, Z., Jin, Y., Yuan, Y., Dong, T. T. X., Tsim, K. W. K. and Zhou, Z. 2018. Flavonoids, a potential new insight of *Leucaena leucocephala* foliage in ruminant health. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66: 7616-7626. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02739

Yong, T., Li, D., Li, M., Liang, D., Diao, X., Deng, C., Chen, S., Xie, Y., Chen, D. and Zuo, D. 2018. Anti-Hyperuricemic effect of 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone-5-sulfonic acid in hyperuricemic mice through XOD. Molecules. 23: 2671. https://doi.org/10.3390/molecules23102671

Yong, T., Zhang, M., Chen, D., Shuai, O., Chen, S., Su, J., Jiao, C., Feng, D. and Xie, Y. 2016. Actions of water extract from *Cordyceps militaris* in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine. Journal of Ethnopharmacology. 194: 403-411. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.001

Zhang, D., Zhao, M., Li, Y., Zhang, D., Yang, Y. and Li, L. 2021. Natural xanthine oxidase inhibitor 5-O-caffeoylshikimic acid ameliorates kidney injury caused by hyperuricemia in mice. Molecules. 26: 7307. https://doi.org/10.3390/molecules26237307

Zhang, L., Liu, Y. and Wang, Y. 2018. Deprotonation mechanism of methyl gallate: UV spectroscopic and computational studies. International Journal of Molecular Sciences. 19: 3111. https://doi.org/10.3390/ijms19103111

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Nematodos asociados al cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) y efecto de rhizobacterias promotoras de crecimiento sobre Meloidogyne incognita (Tylenchida: Heteroderidae)

Nematodes of cucumber (*Cucumis sativus*) and growth-promoting rhizobacteria effect on Meloidogyne incognita (Tylenchida: Heteroderidae)

Fabiola Garrido Cruz[1], Miriam Desireé Dávila Medina[2], Agustín Hernández Juárez[1]*

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. Calzada Antonio Narro # 1923 Col. Buenavista Saltillo, Coahuila. México. C.P. 25315. Tel. 52+8444110209.

[2] Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza # 935 Col. República Ote. Coahuila. México. C.P. 25280. Tel. 52+8444155752.

RESUMEN

Se analizaron muestras de suelo y raíces del cultivo del pepino. Se extrajeron e identificaron los nematodos fitopatógenos presentes. Juveniles de *Meloidogyne incognita* fueron los más abundantes en suelo, otros como *Aphelenchoides* sp., *Pratylenchus* sp., *Tylenchorynchus* sp., y *Aphelenchus* sp. se encontraron con menor presencia. De las raíces se obtuvieron hembras y huevos de *M. incognita*. Con el fin de encontrar alternativas a los productos químicos fumigantes utilizados en exceso, se evaluaron las rizobacterias *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis y Pseudomonas fluorescens*, que fueron fermentadas y filtradas para ponerse en contacto con estos nematodos bajo condiciones *in vitro*, observando su efecto cada 24 h. Los tratamientos se analizaron en concentraciones de 100 % y 50 %. El filtrado de *P. fluorescens* presentó la mejor actividad nematicida, ocasionando una mortalidad de 95 % en la concentración más alta y de 93 % en la concentración de 50 % a las 24 h, seguido por los tratamientos de *B. vallismortis* y *B. velezensis* con 83 y 77 % de respectivamente, en las concentraciones más altas. Los tres tratamientos ocasionaron un 100 % de mortalidad de los nematodos a 48 h de exposición, indicando, que contienen acción nematicida y pueden ser una alternativa viable para el control de estos fitopatógenos.

Palabras clave: *Bacillus vallismortis*; *Bacillus velezensis*; Control biológico; Nematodo agallador; *Pseudomonas fluorescens*.

ABSTRACT

Soil and root samples of the cucumber crop were analyzed. Plant pathogenic nematodes present were extracted and identified. The juveniles of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* were the most abundant in soil, other such as *Aphelenchoides* sp., *Pratylenchus* sp., *Tylenchorynchus* sp., and *Aphelenchus* sp. were found in less presence. Females and eggs of *M. incognita* were obtained from the roots. Finding alternatives to chemicals fumigants, the rhizobacterias *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis* and *Pseudomonas fluorescens* were fermented and filtered to be evaluated on these filiform nematodes under laboratory conditions, observing their effect every 24 h. The treatments were evaluated at concentrations of 100 % and 50 %. The *P. fluorescens* filtrate was the treatment with the best nematicidal activity, causing a mortality of 95 % at the highest concentration and 93 % at the 50 % at 24 h, followed by the treatments of *B. vallismortis* and *B. velezensis* with 83 and 77 % respectively at concentrations of 100 % product. The three treatments showed 100 % mortality of the nematodes after 48 hours of exposure, indicating that these rhizobacteria contain metabolites with nematicidal action that could be a healthy alternative for the control of these phytopathogens.

Key Words: *Bacillus vallismortis*; *Bacillus velezensis*; Biological control; Root knot nematode; *Pseudomonas fluorescens.*

INTRODUCCIÓN

El cultivo del pepino en México tiene gran importancia económica, se ha incrementado en producción y exportación, en el 2022 su producción fue de 1,028,567.57 toneladas (SIAP, 2023). Dentro de los problemas fitosanitarios más importantes, se encuentran diversos géneros de nematodos fitopatógenos, entre ellos los noduladores de raíces, que alcanzan reducciones de la producción de hasta 60 % en agricultura protegida (Ornat *et al*., 1997), disminuyendo la habilidad de la planta de absorber agua y nutrientes del suelo, ocasionando un lento crecimiento y un bajo rendimiento del cultivo (Machado *et al*., 2013). La estrategia más utilizada para controlar infestaciones de nematodos es por medio de la aplicación de plaguicidas a base de organofosforados y carbamatos (Jones *et al*., 2016), anteriormente se utilizaba el Bromuro de metilo, que por su alta toxicidad se ha retirado del mercado (Wang *et al*., 2015; Gupta *et al*., 2017).

En la búsqueda de alternativas para controlar estos nematodos, sin dañar al medio ambiente y a la salud humana, se investigan diversas técnicas como enmiendas orgánicas, solarizaciones, fertilizaciones y control biológico (Collange *et al*., 2011).

Existen bacterias que promueven el crecimiento de las plantas, ya que producen hormonas, solubilizan fósforo, potasio y zinc, e inducen resistencia hacia agentes bióticos o abióticos (Santos *et al*., 2019). Estas bacterias también se han estudiado por su alto potencial como agentes de con-

*Autor para correspondencia: Agustín Hernández Juárez
Correo-e: chinoahj14@hotmail.com
Recibido: 4 de septiembre de 2023
Aceptado: 6 de febrero de 2024
Publicado: 4 de marzo de 2024

trol (Radwan *et al*., 2012). Las principales especies para este propósito, son aquellas encontradas en la rizosfera, donde se presenta una interacción entre las raíces de las plantas y microorganismos del suelo, los cuales se ven influenciados por los exudados radiculares (Mc Near, 2013), entre estas se encuentra el género *Bacillus* Cohn (1872), que ha mostrado actividad nematicida sobre el género *Meloidogyne* Göeldi (Condemarin *et al*., 2018).

Bacillus vallismortis Roberts *et al*. (1996) es una especie poca estudiada como controlador de nematodos, se ha demostrado que es productora de una gran cantidad de metabolitos bioactivos, como la bacilomicina D, con actividad fungistática sobre diversos hongos fitopatógenos (Zhao *et al*., 2010), así como los compuestos Iturin A y surfactina, utilizados para el control de otras enfermedades de plantas (Kaur *et al*., 2017).

Bacillus velezensis (Ruiz-García *et al*., 2005) se encuentra con frecuencia en el suelo, en alimentos fermentados e intestinos de animales, y comúnmente reconocido como un tipo de recurso biológico como *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn y *Bacillus amyloliquefaciens* (ex Fukomoto) (Priest *et al*., 1987) estas últimas, producen enzimas líticas, fitohormonas y compuestos que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (Maung *et al*., 2017). En análisis previos de esta bacteria con propiedades nematicidas, Tian *et al*. (2022), obtuvieron resultados prometedores al evaluar caldos bacterianos y sobrenadantes en juveniles y raíces infectadas de *M. incognita*.

Pseudomonas fluorescens (Flügge) (Migula, 1895), además de ser una bacteria que juega un importante rol en el crecimiento y salud de la planta, se ha descubierto que sus metabolitos secundarios, el 4-diacetylfloroglucinol (DAGP), fenazina y el ácido cianhídrico han mostrado efecto sobre microorganismos fitopatógenos (Hass y Defago, 2005), como huevos y larvas *de Globodera rostochiensis* (Wollenweber), mostrando una disminución en la eclosión y movilidad de estos organismos (Cronin, 1997). El objetivo de esta investigación fue identificar los nematodos fitopatógenos asociados al cultivo de pepino y evaluar *in vitro* los filtrados de las rhizobacterias promotoras de crecimiento *B. vallismortis*, *B. vellezensis* y *P. fluorescens* sobre *M. incognita*, como alternativa de control para este organismo del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en condiciones controladas en el Laboratorio de Entomología Molecular y Alternativas de Control de Plagas del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila.

Se utilizaron nemátodos fitoparásitos extraídos de muestras del cultivo de pepino *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) var. 543 Harris Moran, del municipio de Guadalcázar San Luis Potosí, México. Se realizó un muestreo dirigido a plantas con síntomas típicos de la presencia de nematodos, como clorosis, achaparramiento, y observación de nódulos a la exposición de las raíces.

Las muestras consistían de raíces de las plantas, con aproximadamente 2 kg de suelo de la rizosfera. La extracción de nematodos de suelo se realizó por la metodología de tamizado- centrifugado (Araya *et al*., 1995). La identificación de los géneros de nematodos filiformes extraídos de suelo se realizó con las claves taxonómicas de Siddiqi (2000) y las figuras publicadas por Mai *et al*. (1996).

Las muestras de raíces fueron lavadas y una parte de ellas observadas bajo microscopio estereoscópico, con el fin de extraer manualmente hembras para la identificación de la especie en base a las claves de Eisenback *et al.* (1983).

Otra sección de las raíces extraídas del cultivo fue lavada, seccionada y triturada en un molino eléctrico con 100 mL de agua, para su procesamiento por el método de tamizado-centrifugado. Con este procedimiento se obtuvieron huevos de nematodos, que fueron desinfectados e incubados a 25 °C, para observar su eclosión y utilizar a los juveniles en los bioensayos de mortalidad *in vitro*.

Las bacterias utilizadas para esta investigación fueron *B. vallismortis*, *B. velezensis y P. fluorescens*, otorgadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Una muestra de las bacterias benéficas se agregó en un matraz erlenmeyer de un Litro de capacidad, el cual contenía 300 mL de caldo de Papa, enriquecido con extracto de malta y levadura y se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm durante 5 d a temperatura ambiente (25 ± 5 ° C). Se realizó un filtrado por medio de películas de nylon estériles con abertura de 0.45 µm. El extracto libre de células fue utilizado para las evaluaciones.

Para el bioensayo *in vitro*, se utilizaron placas plásticas de cultivo celular de 24 pozos de acuerdo con el método estándar de Prasad *et al.* (1972). Se evaluaron siete tratamientos (filtrados bacterianos), incluyendo un testigo solo con agua destilada (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos a evaluar para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* extraído de raíces de pepino.
Table 1. Treatments to evaluate the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* control, extracted from cucumber roots.

Tratamientos	Bacteria	Concentración
1	Agua destilada	0
2	*Pseudomonas fluorescens*	100 %
3	*Pseudomonas fluorescens*	50 %
4	*Bacillus velezensis*	100 %
5	*Bacillus velezensis*	50 %
6	*Bacillus vallismortis*	100 %
7	*Bacillus vallismortis*	50 %

Cada pozo fue una unidad experimental, donde se colocaron 15 nematodos juveniles y 500 µL de tratamiento, con 4 repeticiones. Las placas se colocaron en una incubadora (Yamato®) a 25 °C y fueron observadas bajo el microscopio estereoscópico a las 24 y 48 h para el conteo de juveniles muertos y determinar el efecto de los tratamientos sobre los juveniles, bajo un criterio de muerte, la falta de movimiento tras ser inducidos a un estímulo con un fino pincel.

Los datos de mortalidad de *M. incognita* fueron evaluados mediante un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) bajo un diseño experimental completamente al azar mediante el empleo del programa Statistical Analysis System (SAS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los nematodos fitopatógenos extraídos e identificados en las muestras de suelo fueron: *Meloidogyne* sp., *Aphelenchoides* sp., *Pratylenchus* sp., *Tylenchorynchus* sp., y *Aphelenchus* sp., destacando con mayor predominio el género *Meloidogyne*.

En las muestras de raíces se observaron síntomas característicos de agallas y deformaciones (Figura 1) donde se encontraron hembras globosas y masas de huevos (Figuras 2a y b), las cuales fueron extraídas manualmente.



Figura 1. Raíces de plantas de pepino con agallas.
Figure 1. Cucumber plant roots with galls.

Bajo el microscopio estereoscópico se realizaron cortes perineales de las hembras por medio de los cuales se identificó al nematodo agallador *M. incognita*, utilizando como criterio las características del patrón perineal (Figura 3), mostrando un arco dorsal alto y cuadrado, con estrías onduladas, sin líneas laterales visibles.

Los nematodos juveniles de *M. incognita* expuestos a los filtrados bacterianos de *P. fluorescens* en las dos concentraciones, mostraron mortalidad a partir de las 24 h, siendo los tratamientos con mayor actividad nematicida sin diferencia significativa entre estos ($P < 0.05$). En la concentración más alta se presentó 95.9 % de mortalidad, y en la concentración de 50 % un 93.75 %.



Figura 2. a) Hembras de *Meloidogyne incognita* y b) masas de huevos presentes en raíces de Pepino.
Figure 2. a) *Meloidogyne incognita* females and b) egg masses present in Cucumber roots.

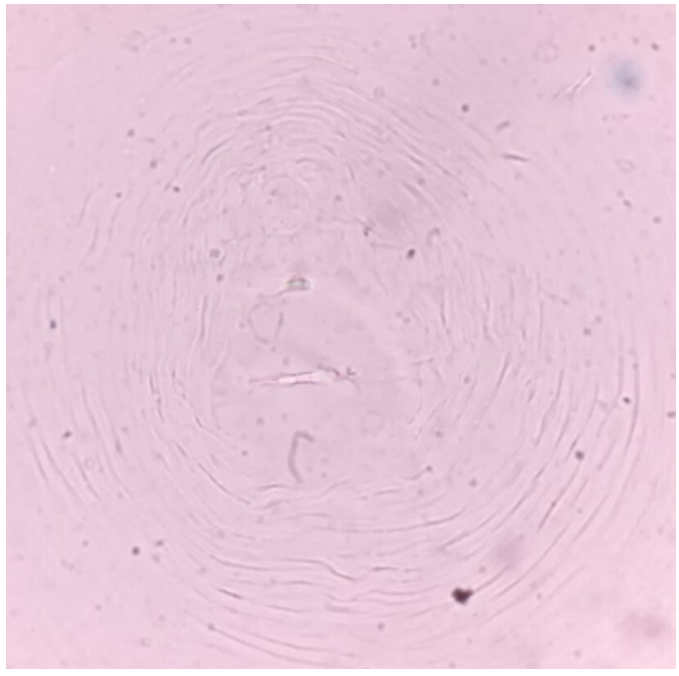


Figura 3. Corte perineal de *Meloidogyne incognita* extraída de agallas de raíces.
Figura 3. Perineal pattern of *Meloidogyne incognita* extracted from root galls.

El filtrado de *B. velezensis* en la concentración de 100 % causó mortalidad significativamente similar al filtrado de *B. vallismortis* con valores de mortalidad de 77.9 y 83.51 % respectivamente ($P < 0.05$).

La concentración al 50 % de *B. velezensis* causó el efecto nematicida más bajo de los tratamientos evaluados con 55.62 % de mortalidad de los juveniles a las 24 horas de exposición a los filtrados bacterianos (Tabla 2).

Después de 48 h de exposición, todos los tratamientos a excepción del testigo, presentaron los valores máximos de mortalidad, no difiriendo significativamente entre estos ($P < 0.05$), alcanzando el 100 % de mortalidad (Tabla 3).

Tabla 2. Mortalidad de juveniles de *M. incognita* a 24 horas de exposición a los tratamientos.
Table 2. Mortality of *M. incognita* juveniles after 24 hours of exposure to the treatments.

Tratamiento	Mortalidad de juveniles (%)
Agua destilada	5.00 d
Pseudomonas fluorescens 100 %	95.30 a
Pseudomonas fluorescens 50 %	93.75 a
Bacillus velezensis 100 %	77.92 ab
Bacillus velezensis 50 %	55.62 c
Bacillus vallismortis 100 %	83.51 ab
Bacillus vallismortis 50 %	73.75 ab

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de P ≤ 0,05, por el procedimiento de comparación de Tukey. *G.l.* = 6.27; *F* = 24.89; *P* < 0.0001; C.V.: 18.14 %

Tabla 3. Mortalidad de juveniles de *M. incognita* a 48 h de exposición de los tratamientos.
Table 3. Mortality of *M. incognita* juveniles after 48 hours of exposure to the treatments.

Tratamiento	Mortalidad de juveniles (%)
Agua destilada	5.00 d
Pseudomonas fluorescens 100 %	100.00 a
Pseudomonas fluorescens 50 %	100.00 a
Bacillus velezensis 100 %	100.00 a
Bacillus velezensis 50 %	100.00 a
Bacillus vallismortis 100 %	100.00 a
Bacillus vallismortis 50 %	100.00 a

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de P≤ 0,05, por el procedimiento de comparación de Tukey. *G.l.* = 6.27; *F* = 361; *P* < 0.0001; C.V.: 4.37 %

De cada tratamiento, se tomaron nematodos filiformes y bajo el microscopio óptico se observaron los efectos sobre estos, en los nematodos del testigo con agua se observó movilidad, el cuerpo hialino, sin deformaciones en el interior y exterior (Figura 4). En los nematodos en contacto con los tratamientos de control, se observaron daños en el intestino, vacuolas en su interior y su notable falta de movilidad en el cuerpo (Figuras 5, 6 y 7).

En esta investigación, el nematodo juvenil predominante en las muestras del cultivo de pepino fue *M. incognita*, el cual causó los síntomas más severos en las plantas, como agallamientos visibles en las raíces. Comercialmente no existen variedades de pepino resistentes a nematodos agalladores, por lo tanto, sin resistencia genética el cultivo del pepino será vulnerable al parasitismo de este tipo de nematodos que causan grandes pérdidas (Hajihassani *et al*., 2019). Ravichandra *et al.* (2014) reporta que los diez géneros de nematodos de mayor importancia económica, de acuerdo con la severidad de daño ocasionado en los cultivos hortícolas a nivel mundial son *Meloidogyne* spp., *Radopholus* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus* spp., *Ditylenchus* spp., *Tylenchulus* spp., *Helicotylenchus* spp. y *Xiphinema* spp. En el cultivo de pepino se encontró a *Meloidogyne* sp. y *Pratylenchus* sp, los cuales representan riesgo en este cultivo. La presencia de *Pratylenchus* sp. es de suma importancia, ya que es un nematodo lesionador de las raíces hospederas, ocasionando heridas en el sistema radical como vía de entrada para otros fitopatógenos como hongos y bacterias (Villain *et al*., 1999). Especies del género *Aphelenchoides* son fungívoros y están asociados a tejidos en descomposición (Yeates, 1999), en este análisis se encontró a este género en menor cantidad que *Meloidogyne* sp. Estos nematodos se encuentran en una gran diversidad de plantas asociadas, no tienen hospedero específico (Sánchez-Monge *et al*., 2015), ya que se han reportado más de 700 especies de 85 familias botánicas (Kohl, 2011). Dentro de este género se encuentran los nemátodos foliares y de los brotes que causan deformaciones y necrosis en hojas, como *A. ritzemabosi*, *A. fragarie* y *A. besseyi*, que invaden hojas y tejidos de una gran cantidad de especies de plantas (Idowu and Keneth, 2021), estos daños no se observaron en las plantas seleccionadas para muestreo. Este género también se puede comportar como ectoparásito, afectando puntos de crecimiento (Eppo, 2017).



Figura 5. *Meloidogyne incognita* expuesto al tratamiento de *Bacillus velezensis*.
Figura 5. *Meloidogyne incognita* exposed to *Bacillus velezensis* treatment.



Figura 6. *Meloidogyne incognita* expuesto al tratamiento de *Pseudomonas fluorescens.*
Figure 6. *Meloidogyne incognita* exposed to *Pseudomonas fluorescens* treatment.



Figura 7. *Meloidogyne incognita* expuesto al tratamiento de *Bacillus vallismortis.*
Figure 7. *Meloidogyne incognita* exposed to *Bacillus vallismortis* treatment.

En las raíces analizadas, además de agallas, se encontraron daños como decoloraciones, probablemente por la presencia del género *Pratylenchus* sp., que ocasiona numerosas lesiones, o de *Tylenchorynchus* sp., que se identificó en el suelo, y del cual se ha demostrado que los síntomas causados por este nematodo van acompañados con decoloración del tallo y clorosis en el sistema foliar (Handoo *et al*., 2007). En el cultivo de pepino se encontró además *Aphelenchus sp.* y *Aphelenchoides* sp. En México, se han detectado estos dos géneros, en cultivos de papa sin causar daño a las plantas (Montes Belmont, 2002). Por otra parte, Baldwind *et al.* (2004) describe al género *Aphelenchus* como degradador de hongos.

Para el control de estos nematodos, principalmente los agalladores, usualmente se utilizan nematicidas no fumigantes y fumigantes, los cuales son extremadamente tóxicos a humanos y a otro tipo de organismos benéficos (Zasada *et al*., 2010).

Bacillus y *Pseudomonas* son géneros de bacterias predominantes que se han identificado como promotoras del crecimiento vegetal (Podile y Kishore, 2007), además de excretar metabolitos con actividades frente a patógenos (Siddiqui y Shaukat, 2003). Los filtrados bacterianos de la presente investigación en las concentraciones del 50 % mostraron excelente efecto al inactivar a las poblaciones de nematodos, observando parálisis en el cuerpo y detención de movilidad desde las 24 horas de exposición con el tratamiento.

Los filtrados de *B. velezensis* han sido evaluados para la inhibición de bacterias como *Micrococcus flavus (Liu et al., 2007)*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus (Frankland y Frankland, 1887) en medios de cultivo, mostrando actividad antimicrobial. Tian et al. (2022),* evaluó la mortalidad de J2 de *M. incognita in vitro*, inmersos por 24 h en sobrenadantes de *B. velezensis* cepa Bv-25, obteniendo una mortalidad de 78.3 y 59.5 % en concentraciones del 100 y 10 % respectivamente, similar a los resultados mostrados en este estudio, con una mortalidad de 77.91 y 55.2 % a las concentraciones de 100 y 50 % respectivamente.

B. vallismortis ha mostrado efectos sobre diversos hongos fitopatógenos, se le atribuye a la presencia de compuestos como Bacillomycina D (n-C14) y Bacillomycina D (iso-C15) con acción contra estos microorganismos (Zhao *et al*., 2010). Pruebas cuantitativas han demostrado el incremento de unidades formadoras de colonias de la bacteria *B. velezensis* en raíces inoculadas. Esto indica que la colonización de esta bacteria en la planta es rápida y puede suprimir el parasitismo de nematodos como *M. incognita* (Tian *et al*., 2022).

Especies de *Bacillus* producen metabolitos secundarios, como lipopéptidos con potencial importante como inhibidores de fitopatógenos (Ongena *et al*., 2008; Théatre *et al*., 2021).

En este estudio a 24 h de exposición se observó una mortalidad del 95 % sobre juveniles con la bacteria *P. fluorescens*, atribuida a enzimas como la Proteasa AprA, la cual se ha detectado en algunas cepas de esta rizobacteria; como metabolito encargado del biocontrol sobre *Meloidogyne* sp. (Siddiqui *et al*., 2003). Se ha descubierto que uno de los metabolitos importantes producidos por *Pseudomonas* sp., es el 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), compuesto fenólico con actividad antifúngica, antibacteriana, antihelmíntica y fitotóxica de amplio espectro (Keel *et al*., 1992; Dowling y O'Gara, 1994), por el cual se le puede atribuir su excelente efecto nematicida en esta investigación.

El control biológico se ha convertido en una herramienta eficaz para el manejo de enfermedades de plantas, con esta investigación se ofrecen nuevas alternativas nematicidas, que deberán continuar evaluándose en invernadero y campo, además de identificar los metabolitos presentes en las rizobacterias y determinar su actividad nematicida para problemas de fitosanidad.

CONCLUSIONES

Los microorganismos son una herramienta eficaz sobre fitopatógenos. Los filtrados libres de células de *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis y Pseudomonas fluorescens* en sus dos concentraciones, presentan una rápida y eficiente acción letal sobre nematodos juveniles.

Se comprueba que existen alternativas a los productos químicos fumigantes que se han utilizado en exceso para el control de nematodos fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca postdoctoral otorgada al primer autor.

REFERENCIAS

Araya, M., Centeno, M., y Carrillo, W. 1995. Densidad poblacional y frecuencia de los nematodos 34 parásitos de banano (*Musa* AAA) en nueve cantones de Costa Rica. Costa Rica. *Corbana 20*(43):6-11.

Baldwin, J. G., Nadler, S. A., y Adams, B. J. 2004. Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annu Rev Phytopathol. 42*:83-105. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.012204.130804. PMID: 15283661.

Cohn, F. 1872. Untersuchungen über Bakterien. Pages 127-224 in: Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1, 1875 (Heft 1), J. U. Kern's Verlag (Max Müller), Breslau. Recuperado de https://www.biodiversitylibrary.org/page/5105059#page/2/mode/1up.

Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., y Tchamitchian, M. 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection 30*(10), 1251-1262.

Condemarin, C. 2018. Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nematodo agallador radicular, *Meloidogyne javanica*. en condiciones in vitro y producción de biomasa. *Arnaldoa*, *25*(2), 515-528. doi:10.22497/arnaldoa.252.25211.

Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Dunne, C., y O'Gara, F. 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *European Journal of Plant Pathology*,*103*, 433-440. doi:10.1023/A:1008662729757

Dowling, D. N., y O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.*12(4)133-144. doi:10.1016/0167-7799(94)90091-4

Eisenback, D. J., Hirschmann, H., Sasser, N. J. y Triantaphyllou, C. A. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne especies*), con una clave pictórica. International Meloidogyne Project. Raleigh, North Carolina, USA.

EPPO. 2017. PM 3/83 (1) Fragaria plants for planting inspection of places of production. Bulletin OEPP/ EPPO. Bulletin. *43*(3),471-495. doi: 10.1111/epp.12408.

Frankland, G. C. y Frankland, P. F. 1887. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B*, 178, 257-287.

Flügge C. 1886. Die Mikroorganismen. 2. Aufl. 692 Verlag von F. C. W. Vogel, Leipzig.

Gupta, R. C., Miller Mukherjee I. R., Doss R. B., Malik J. K. y Milatovic D. 2017. Organophosphates and Carbamates. *Reproductive and Developmental Toxicology* (2), Academic Press, 609-631.

Haas, D., y Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*,3(4),307-319. doi:10.1038/nrmicro1129.

Hajihassani, A., Davis, R., y Timper, P. 2019. Evaluation of selected nonfumigant nematicides on increasing inoculation densities of *Meloidogyne incognita* on Cucumber. *Plant Dis*. (12) 3161-3165. doi: 10.1094/PDIS-04-19-0836-RE.

Handoo, Z. A., Khan, A., e Islam, S. 2007. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Merlinius* Siddiqi, 1970 (Nematoda:Tylenchida) with description of *Merlinius khuzdarensis* n.sp. associated with datepalm *Nematology*, *9*(2), 251-260.

Rotifa, I. J., y Evans K. A. 2021. Use of acibenzolar-S-methyl and other novel products for the management of *Aphelenchoides fragariae* on ornamental plants in glasshouse and commercial conditions. *Crop Protection*, *141*. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105467

Jones J. G., Kleczewski N. M., Desaeger J., y Meyer S. F. L. 2016. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. Crop Protection, *96*,151-157.

Kaur, P. K., Joshi, N., Singh, I. P., y Saini, H.S. 2017. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *J Appl Microbiol, 122*(1),139-152. doi: 10.1111/jam.13303.

Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., y De´fago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Molecular Plant– Microbe Interaction *5*(1), 4-13.

Kohl, L. 2011. Foliar Nematodes: A Summary of Biology and Control with a Compilation of Host Range. *Plant Health Progress* 12(1), 23. doi:10.1094/php-2011-1129-01-rv

Liu, X. Y., Wang, B. J., Jiang, C. Y., y Liu, S. J. 2007. *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(1), 66-69. doi:10.1099/ijs.0.64489-0

Liu Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., y Zhong, J. 2020. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *J Appl Microbiol.128*(1):242-254. doi: 10.1111/jam.14459.

Machado, A. C. Z., Dorigo, O. F., y Mattei, D. 2013. First Report of the Root Knot Nematode, *Meloidogyne inornata*, on Common Bean in Paraná State, Brazil. *Plant Disease*, *97*(3), 431-431.

Mai, W. F., Mullin, P. G., Lyon, H.H., y Loeffler, K. 1996. Plant-parasitic nematodes. *A Pictorial Key to Genera*. Cornell University Press. Nueva York. 277.

Maung, E. C. H., Choi, T. G., Nam, H. H., y Kim, K. Y. 2017. Role of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 in the Control of *Fusarium* Wilt Disease and Growth Promotion of Tomato. *Biocontrol Sci. Technol*. 27, 1400-1415 doi:10.1080/09583157.2017.1406064

McNear Jr., D. H. 2013. The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nat. Educat. Knowledge 4* (3):1.

Migula W. 1895. "Bacteriaceae (Stabchenbacterien)." In: Engler and Prantl (Editors), Die Naturlichen Pflanzenfamilien. W. Engelmann, Leipzig, 20-30.

Montes–Belmont, R. 2002. Nematología vegetal en México. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Sonora, México. 98 p

Ongena, M., y Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*,*16*, 115-125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009. PMID: 18289856.

Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., y Sorribas. F.J. 1997. Effect of the previous crop on population densities of *Meloidogyne javanica* and yield of cucumber. *Nematropica* (27), 85-90.

Podile, A. R., y Kishore, G. K. 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria. In S.S. Gnanamanickam (Ed.) *Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht, 195-230. doi: 10.1007/978-1-4020-4538-76.

Prasad, S., Tilak, K., y Gollakota, R. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. thuringiensis on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne*. spp. The causative agent of root-knot disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, *20*. 377-378.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., y Berkeley, R. C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *37*(1), 69-71. doi:10.1099/00207713-37-1-69.

Radwan, M., Farrag, S., Abu-Elamayem, M., y Ahmed, N. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*. *56*, 58-62, doi: 10.1016/j.apsoil.2012.02.008.

Ravichandra N. G. 2014. *Horticultural Nematology*. Springer India, 411. doi: 10.1007/978-81-322-1841-8.

Roberts, M., Nakamura, L., y Cohan, F. 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis* isolated from soil in Death Valley, California. *Int J Syst Bacteriol. 46* (2),470-475. doi:10.1099/00207713-46-2-470.

Ruiz-García, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E. 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55:191-195. doi:10.1099/ijs.0.63310-0.

Sánchez-Monge, A., Flores, L., Salazar, L., Hockland, S.H., y Bert, W. 2015. An updated list of the plants associated with plant-parasitic *Aphelenchoides* (Nematoda: Aphelenchoididae) and its implications for plant-parasitism within this genus. *Zootaxa, 4013 (2)*, 207-24. doi: 10.11646/zootaxa.4013.2.3

Santos, M., Nogueira, M., y Hungria, M. 2019. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and

previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express 9*,205. doi: 10.1186/s13568-019-0932-0.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. 2023. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado de https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/

Siddiqi, R. 2000. Tylenchida: Parasites of plants and insects. CAB International. Londres. 848 p.

Siddiqui, I. A., y Shaukat, S. S. 2003. Plant species, host age and host genotype effects on *Meloidogyne incognita* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically-modified derivatives. *Journal of Phytopathology,151*(4),231-238.

Théatre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J.; Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., y Medema, M.H. 2021. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: Natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Front. Bioeng. Biotechnol*,*2*(9),623-701. doi: 10.3389/fbioe.2021.623701.

Tian, X., Zhao, X., Zhao, S., Zhao, J., Mao, Z. 2022. The Biocontrol Functions of *Bacillus velezensis* Strain Bv-25 Against *Meloidogyne incognita*. *Front Microbiol*,7(13),843. doi: 10.3389/fmicb.2022.843041.

Villain, L., Anzueto, F., Hernández, A., y Sarah, J. 1999. Los nematodos parásitos del cafeto. En: *Desafios de la caficultura en Centroamérica*. (pp. 327-367). Francia. 496 p Editorial: B. Bertrand y B. Rapidel. CIRAD.

Wang, G. L., Chen, X. L., Chang, Y. N., Du, D., Li, Z. y Xu, X. Y. 2015. Synthesis of 1,2,3-benzotriazin-4-one derivatives containing spirocyclic indoline-2-one moieties and their nematicidal evaluation. Chinese Chemical Letters, *26*(12), 1502-1506. doi: 10.1016/j.cclet.2015.10.024

Yeates, G. 1999. Effects of plants on nematode community structure. *Ann Rev Phytopathol. 37*(1):127-149. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.127.

Zasada, I. A., Walters, T. W. y Pinkerton, J. N. 2010. Post-plant nematicides for the control of root-lesion nematode in red raspberry. *HortTechnology* 20:856-862.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., y Gu, Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour Technol.101*(1):292-297. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.071. Epub 2009 Aug 29. PMID: 19717300.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Effect of the extrusion process on the physicochemical, phytochemical, and cooking properties of gluten-free pasta made from broken rice and chickpea flours

Efecto del proceso de extrusión sobre las propiedades fisicoquímicas, fitoquímicas, y de cocción de pastas libres de gluten elaboradas a partir de harinas de arroz quebrado y garbanzo

Samuel Arturo Delgado-Murillo[1], José de Jesús Zazueta-Morales[1], Armando Quintero-Ramos[2], Yazmín Alejandra Castro-Montoya[1], Xóchitl Ariadna Ruiz-Armenta[1], Víctor Limón-Valenzuela[1] and Carlos Iván Delgado-Nieblas[1]*

[1] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calzada de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. C.P. 80013. Phone: (52) 6677136615.

[2] Departamento de Investigación y Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario s/n Campus Universitario 2, Chihuahua, Chihuahua, México. C.P. 31125. Phone: (52) 6142366000.

ABSTRACT

Gluten-free pasta (GFP) can be produced using materials such as broken rice and chickpea flour. The objective of this work was to study the effect of the extrusion process on the physicochemical, phytochemical, and cooking properties of GFP. The effect of extrusion temperature (ET: 90.18–123.8 °C), screw speed (SS: 76.6–157.3 rpm), and chickpea flour content (CHF: 0.23–23.7 %) was studied using the response surface methodology for the statistical analysis. The cooking loss diminished by combining high ET with intermediates CHF, and by combining intermediates SS with intermediates-high CHF. The cooking time diminished by combining high ET with high CHF and intermediate to high SS. The color *b** increased at high CHF. Total phenolic compounds decreased by combining low ET with low CHF, as well as low ET with high SS. The optimal conditions were ET = 117 °C, SS = 134.4 rpm, and CHF = 12.57 %. Total, insoluble, and soluble dietary fiber were higher in the extruded treatment compared with the unextruded mixture. GFP with similar sensory acceptability to a commercial product was obtained, showing adequate physicochemical, phytochemical, and cooking properties, whose consumption presents potential health benefits.

Keywords: celiac disease; food by-products; bioactive compounds; optimization.

RESUMEN

Las pastas sin gluten (PSG) pueden producirse utilizando materiales como arroz quebrado y garbanzo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del proceso de extrusión sobre propiedades fisicoquímicas, fitoquímicas, y de cocción de PSG. Se estudió el efecto de temperatura de extrusión (TE: 90.18 – 123.8 °C), velocidad de tornillo (VT: 76.6 – 157.3 rpm), y contenido de harina de garbanzo (CHG: 0.23 – 23.7 %), utilizando la metodología de superficie de respuesta para el análisis estadístico. La pérdida de sólidos por cocción disminuyó combinando altas TE con intermedios CHG, y combinando intermedios VT con intermedios-altos CHG. El tiempo de cocción disminuyó combinando altas TE con altos CHG, e intermedios-altos VT. El color *b** aumentó utilizando altos CHG. El contenido de compuestos fenólicos totales disminuyó combinando bajas TE con bajos CHG, y combinando bajas TE con altas VT. Las condiciones óptimas fueron TE = 117 °C, VT = 134.4 rpm, y CHG = 12.57 %. La fibra dietaria total, insoluble y soluble fue mayor en el tratamiento extrudido comparado con la mezcla sin extrudir. Se obtuvieron PSG con aceptabilidad sensorial similar a un producto comercial, mostrando adecuadas propiedades fisicoquímicas, fitoquímicas, y de cocción, cuyo consumo presenta beneficios potenciales para la salud.

Keywords: enfermedad celíaca; subproductos alimenticios; compuestos bioactivos; optimización.

INTRODUCTION

Celiac disease, also known as "gluten-sensitive enteropathy", is defined as a chronic immune-mediated small intestinal mucosa inflammation in genetically predisposed individuals, that results in malabsorption due to atrophy of the intestinal villi (García-Almeida *et al.*, 2012). Currently, the only effective treatment to prevent this disease is a strict gluten-free diet for life, which involves eliminating all foods containing cereals such as wheat, barley, and rye. Gluten-free foods have been produced and distributed for patients with celiac disease and gluten-related disorders, or people who want to follow a gluten-free diet due to the health benefits attributed to them, including weight loss and reduction of the risk of future gastrointestinal diseases (Bouasla and Wójtowicz, 2021). Among the most consumed foods by the population is pasta because it has low cost, is easy to prepare, versatile, has adequate sensory attributes, and has a long shelf life (Romano *et al.*, 2021).

Due to its wide diffusion, the World Health Organization (WHO) and the Food and Drug Administration (FDA) consider pasta to be a good vehicle for nutrient incorporation, helping to improve the health of consumers (Foschia *et al.*, 2013). Durum wheat semolina is the most used raw material for

*Author for correspondence: Carlos Iván Delgado-Nieblas
e-mail: cidelgadonieblas@uas.edu.mx
Received: september 03, 2023
Accepted: january 19, 2024
Published: february 19, 2024

pasta production. However, there are different research works where raw materials rich in nutrients such as proteins, vitamins and minerals, and dietary fiber have been added during pasta production. The semolina has been partially replaced by unconventional flours of legumes such as pea (Torres *et al.*, 2007) and chickpea (Saget *et al.*, 2020). However, substituting wheat semolina is a technological challenge since gluten contributes to the development of the dough and prevents the disintegration of the pasta during cooking in hot water. Therefore, the substitution of this material for pasta production provides difficult structural properties to maintain the quality of this food during cooking and handling.

Rice (*Oryza sativa* L.) is a cereal that can be used instead of wheat to prepare gluten-free foods due to its characteristics of being colorless, a mild flavor, easy digestibility, and hypoallergenic (Qin *et al.*, 2021). It is wanted to produce rice-based pasta with the addition of legumes, which are useful food ingredients for many final applications due to their high nutritional value, respect for the environment, and cost savings. Legumes are a good source of proteins, resistant starch, dietary fiber, vitamins, minerals, and bioactive compounds, such as phenolic acids and flavonoids. Among the technologies most used for the production of pasta is extrusion cooking, which presents high productivity favors, significant nutrient retention, and minimal processing time required compared to conventional cooking. There are different quality parameters in pasta, highlighting the cooking properties (cooking loss and cooking time), which can be influenced by the extrusion process and the raw materials used for its production (Bresciani *et al.*, 2022). The high temperatures and shear stresses reached during the extrusion process, could cause damage to macromolecules such as starch, proteins, dietary fiber, phenolic compounds, and other functional compounds, affecting the quality of the pasta. Therefore, it is desirable to obtain the best extrusion processing conditions from the optimization through response surface methodology, a very important tool that can be used to obtain pasta with better properties (Jalgaonkar *et al.*, 2019). Although, the mixture of cereals and legumes has been used for the development of extruded products, currently, no research papers have been found where broken rice and chickpeas are combined for the production of gluten-free pasta.

For the above, the aim of this work was to study the effects of the extrusion process on the physicochemical, phytochemical, and cooking properties of gluten-free pasta made from broken rice and chickpea flour.

MATERIAL AND METHODS

Raw materials

The raw materials used in this research were broken rice (*Oryza sativa* L.), a by-product from the Ansera industry, and extruded chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour donated by the Macfrut company. Both companies are located in Culiacan, Mexico. Broken rice flour was obtained by grinding this material in a hammer mill (Pulvex model 200, Mexico City, Mexico) and sieved to obtain products with a particle size < 420 µm. The raw materials ratio to produce GFP in the different treatments was obtained through a preliminary study, varying the content of CHF according to the experimental design (Table 1).

Table 1. Experimental design for the extrusion study.
Tabla 1. Diseño experimental para el estudio de extrusión.

Assay	Coded levels			Actual levels		
	X_1	X_2	X_3	ET (°C)	SS (rpm)	CHF (%)
1	-1	-1	-1	97	93	5
2	1	-1	-1	117	93	5
3	-1	1	-1	97	141	5
4	1	1	-1	117	141	5
5	-1	-1	1	97	93	19
6	1	-1	1	117	93	19
7	-1	1	1	97	141	19
8	1	1	1	117	141	19
9	-1.682	0	0	90.18	117	12
10	1.682	0	0	123.8	117	12
11	0	-1.682	0	107	76.6	12
12	0	1.682	0	107	157.3	12
13	0	0	-1.682	107	117	0.23
14	0	0	1.682	107	117	23.7
15	0	0	0	107	117	12
16	0	0	0	107	117	12
17	0	0	0	107	117	12
18	0	0	0	107	117	12
19	0	0	0	107	117	12
20	0	0	0	107	117	12

ET= extrusion temperature; SS: screw speed; CHF= Chickpea flour content.

Extrusion process

The GFP was produced by extrusion using a twin-screw extruder (Shandong Light, Model LT32L, China) with three heating zones. The temperature of the mixing/cooking zone varied according to the experimental design from 90.18 °C to 123.8 °C, whereas the temperature of the feeding and exit zones were kept constant at 75 °C and 80 °C, respectively. During the processing an output die with 2 circular openings of 2 mm was used. Also, two screws with a compression ratio of 2:1 were used, and the SS varied from 76.6 rpm to 157.1 rpm, according to the experimental design. Likewise, the moisture content of the mixtures was kept constant at 28 %. The obtained pasta was maintained in a room with ventilation and controlled temperature (25 ± 1 °C) for 24 h and then stored in sealed plastic bags at room temperature (25 ± 1 °C) until its analysis.

Proximal analysis

The proximal composition of the raw materials and the GFP obtained under optimal extrusion conditions were analyzed

in triplicate according to the methodology reported by the AOAC (2012) for protein (960.52), fat (920.39), ash (923.03), moisture (925.10), and crude fiber (962.09). Also, carbohydrates were determined by the difference from the other components. The energy values of pasta were determined by multiplying the protein and carbohydrate values of the sample by their calorific value (4 kcal/100 g) and the fat value by its calorific value (9 kcal/100 g) (Bolarinwa and Oyesiji, 2021).

Cooking loss (CL)

The CL determination in pasta was carried out by using 50 g of product cut into 5 cm long pieces following the methodology described by AACC 16 - 50 (2000). This measurement denotes the solids lost in the cooking water. Three measurements were made for each treatment.

Cooking time (CT)

This measurement represents the time required for the dried central core to disappear when gently compressed between two glass plates (D'Egidio *et al*., 1990), and the experiments were performed in triplicate.

Color parameter *b**

A tristimulus colorimeter (Minolta, CR-210, Tokyo, Japan) was used to measure the color parameter *b**. Samples of pasta of different treatments were milled to a particle size less than 250 µm. The milled samples were placed in 5 cm Petri dishes, and three equidistant readings were done.

Total phenolic compounds (TPC)

The procedure described by Adom and Liu (2002) was used with some modifications for the extraction of free and bound fractions of phenolic compounds. This determination was performed using the Folin Ciocalteu spectrophotometric method, according to the procedure described by Heimler *et al.* (2006), with some modifications. Four replicates were performed for each treatment, measuring the absorbance at 760 nm with a Model 10 spectrophotometer, UV GENESYS, Series AQ7-2H7G229001, USA. The TPC values were obtained from the sum of free (FPC) and bound phenolic compounds (BPC), and the results were reported in mg gallic acid equivalents (GAE)/ g d.b.

Optimization

The optimization process was performed using the numerical method with the software Design-Expert 11.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). The response variables used to optimize were CT, CL, color parameter *b**, and TPC. The optimization aimed to find the best processing conditions to obtain the lowest CT and CL values and the highest color parameter *b** and TPC values. The criteria for carrying out the optimization process using the responses mentioned above, were values of CT < 11 min (found in a commercial rice pasta) and values of CL < 12 % (obtained in a commercial pasta). Also, another criterion was to obtain color *b** values > 7.04 (found in a commercial rice pasta) and the highest TPC values. An increase in TPC is associated with greater antioxidant activity and with positive effects in reducing the incidence of different diseases. This information was used to evaluate the desirability function, which is one of the most widely used techniques for optimizing processes with multiple responses in the food industry, varying the desirability from 0 (lower) to 1 (higher), according to Myers and Montgomery (1995). Two experimental tests were carried out under optimal conditions, and CT, CL, color *b**, and TPC were evaluated in triplicate by comparing their obtained values against the predicted values by the mathematical models.

Dietary fiber (DF)

The DF analysis was carried out according to the methodology described by the AOAC (2012), using the 985.29 method. This determination was performed in the control pasta (without chickpea), pasta obtained in the optimal processing conditions, and commercial pasta. This test is based on starch and protein removal using a TDF-100A enzyme kit (Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA), which consists of three enzymes: a heat-stable amylase, a protease, and an amyloglucosidase. The insoluble (IDF) and soluble (SDF) dietary fiber fractions were obtained by filtration.

Sensory analysis (SA)

The sensory acceptability of both, the GFP obtained under optimized conditions, and a commercial gluten-free pasta were evaluated. For this, 120 untrained panelists of both genders, over 18 years old, carried out the evaluation. A general acceptability test was performed using a 9-point hedonic scale, where 1 = dislike extremely, 2 = dislike very much, 3 = dislike moderately, 4 = dislike slightly, 5 = neither like nor dislike, 6 = like slightly, 7 = like moderately, 8 = like very much, and 9 = like extremely, according to the procedure reported by Lim (2011).

Statistical analysis

The statistical data were analyzed with a central composite rotatable experimental design with an α value = 1.682. The independent variables were ET (°C), SS (rpm), and CHF (%), with five levels for each factor (Table 1). For the multiple regression (MSR) and prediction of the experimental behavior of data, the quadratic models obtained with the statistical program Design Expert (Stat-Ease, 2018) version 11.0 were used. The mathematical model was:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

Where Y_i is the generic response, X_1 is the ET, X_2 is the SS, X_3 is the CHF, and b_0, b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_1b_2, b_1b_3, and b_2b_3 are the regression coefficients. The mean comparisons were performed with the LSD Fisher test using the Design Expert statistical program (Stat-Ease, 2018) version 11.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximal analysis

Table 2 shows the proximal composition of the raw materials, broken rice flour (BRF) and chickpea flour (CHF) used to

Table 2. Chemical composition and energy value of the raw materials broken rice flour (BRF), chickpea flour (CHF), and control pasta (CP), optimal pasta (OP), commercial rice pasta (CRP), and commercial wheat semolina pasta (CWP).
Tabla 2. Composición química y valor energético de las materias primas harina de arroz quebrado (HAQ), harina de garbanzo (HG), y pasta control (PC), pasta óptima (PO), pasta de arroz comercial (PAC), y pasta de semolina de trigo comercial (PSTC).

Sample	Dry weight (%)	Ash (%)	Protein (%)	Fat (%)	Crude fiber (%)	Carbohydrates (%)	Energy value (kcal/100 g)
Raw materials							
BRF	90.24 ± 0.01	0.63 ± 0.02	7.4 ± 0.01	0.45 ± 0.01	2.34 ± 0.17	89.18 ± 0.20	390.37 ± 0.03
CHF	93.76 ± 0.02	3.79 ± 0.03	19.83 ± 0.23	5.10 ± 0.23	9.48 ± 0.17	61.80 ± 0.10	372.42 ± 0.04
Pasta							
CP	89.60 ± 0.02^{b}	0.58 ± 0.03^{d}	2.41 ± 0.4^{d}	0.01 ± 0.002^{c}	0.51 ± 0.04^{d}	96.49± 0.02^{a}	395.69 ± 0.02
OP	89.32 ± 0.01^{c}	1.04 ± 0.01^{a}	11.18 ± 0.01^{a}	0.04 ± 0.001^{b}	1.20 ± 0.01^{b}	86.54 ± 0.01^{c}	391.24 ± 0.02
CRP	91.23 ± 0.12^{a}	0.75 ± 0.01^{c}	3.03 ± 0.01^{c}	0.01 ± 0.001^{c}	0.98 ± 0.01^{c}	95.23 ± 0.01^{b}	393.13 ± 0.03
CWP	89.2 ± 0.02^{d}	0.88 ± 0.03^{b}	10.03 ± 0.01^{b}	0.2 ± 0.02^{a}	3.02 ± 0.01^{a}	85.87 ± 0.01^{c}	385.40 ± 0.02

Data are presented as mean ± standard deviation, means with different superscript letters in the same column are significantly different (LSD test; $p < 0.05$).

produce the GFP, and the gluten-free optimized pasta (OP) and control pasta (CP) obtained under optimal processing conditions. The obtained values in BRF were similar to those reported by Feizollahi *et al.* (2018) in BRF from Hashemi and Tarom varieties. Also, the values found in CHF are slightly lower than those reported by Chávez-Ontiveros *et al.* (2022), except for carbohydrates. This could be due to the different processing conditions used to process the raw materials and the growing agronomic and temporal conditions. Likewise, the lipids, crude fiber, and ashes values obtained in OP are slightly lower than those reported by Sofi *et al.* (2020) in a gluten-free pasta made with rice flour and germinated chickpea of two different varieties (GNG 1581CF and GNG 469), whereas protein and carbohydrate contents were higher. The difference in the proximal composition between both research could be due to the chickpea germination process and the processing conditions used to produce the pasta. Likewise, OP showed higher values of ashes, proteins, and dietary fiber compared to CP, which could be due to the important contribution of these compounds by chickpea flour since CP only had broken rice in its composition. Also, OP showed higher ashes and protein content than commercial pasta (CRP and CWP).

Regression coefficients and statistical analysis

The regression coefficients and analysis of variance for the response variables evaluated in pasta are shown in Table 3. The dependent variables were fitted to a second-order model. All the evaluated parameters showed a significant model ($p < 0.001$), with R^2_{adj} values ≥ 0.77, and none of the parameters showed a lack of fit ($p > 0.05$). Statistical analysis (Table 3) indicated that the ET factor showed a significant effect ($p < 0.05$) in the linear term on CL, CT, and TPC. Whereas the SS factor has a significant effect ($p < 0.05$) in the linear term on the color parameter *b**. Also, the CHF factor showed a significant effect ($p < 0.05$) in the linear term on *b** and TPC. Likewise, the SS factor has a significant effect ($p < 0.05$) in the quadratic term on CL and CT. Also, the CHF has a significant effect ($p < 0.05$) in the quadratic term on CL and *b**. Likewise, the analysis showed that the ET*SS interaction only presented a significant effect ($p < 0.05$) on TPC. The ET*CHF interaction showed a significant effect ($p < 0.05$) on CL, CT, *b**, and TPC. Also, the SS*CHF interaction showed a significant effect ($p < 0.05$) on CL and CT.

Cooking loss (CL)

The loss of solids during the cooking process of pasta is undesirable since it is generated by the solubilization of compounds such as starches, proteins, and minerals, which pass into the cooking water. This loss causes pasta to lose its shape (Granito *et al.*, 2014), and the CL can be attributed to amylose leaching. The effect of ET and CHF content on the CL of pasta at a constant level of SS = 117 rpm is presented in Figure 1a. It can be observed that the lowest CL values (< 6 %) occurred at high ET (>107 °C) combined with medium CHF contents (10-20 %). This can be attributed to the fact that by increasing the ET, the viscosity of the molten starch decreased, which reduced friction or shear in the extruder and the molecular degradation, decreasing the CL. This behavior coincides with the information presented by Jalgaonkar *et al.* (2019), who observed that in pasta production from wheat semolina and pearl millet, increasing ET caused a decrease in CL from 10 to 7 %. Also, the effect of SS and CHF content on CL at a constant level of ET = 107 °C is presented in Figure 1b. It can be observed that the lowest values of CL (< 6 %) occurred at intermediate values of SS (90-144 rpm) combined with intermediate to high values of CHF (8-18 %). This could be related to the decrease in starch proportion in the pasta when the CHF levels were increased due to the elevated protein values shown by this legume. This could have caused a strong interaction protein-water, thus reducing the diffusion coefficient of amylose in the cooking water. Another factor that could favor the decrease in CL is the protein-starch interaction, maintaining the structural integrity of the pasta (Padalino *et al.*, 2015). This behavior is similar to that reported by Suo *et al.* (2022), who mentioned that the cooking losses were significantly reduced by increasing the chickpea content from 0 to 75 %, a cooking loss value lower than 12 % is considered acceptable for good quality pasta (Hoseney, 1999).

Table 3. Regression coefficients of the models, significance levels, analysis of variance, and predicted/ true values, in the optimization process of gluten-free pasta with addition of broken rice and chickpea flour.
Table 3. Coeficientes de regresión de los modelos, niveles de significancia, análisis de varianza, y valores predichos/reales en el proceso de optimización de pastas sin gluten con adición de arroz quebrado y harina de garbanzo.

	CL	CT	Color *b**	TPC
Intercept	**47.46**	**5.50**	**52.83**	**4.27**
Linear				
ET	0.092 (0.001)	0.0019 (<0.01)	-0.66 (0.393)	-0.022 (<0.001)
SS	-0.68 (0.064)	0.32 (0.141)	-0.17 (0.011)	-0.062 (0.090)
CHF	-0.39 (0.079)	-0.18 (0.443)	2.78 (0.011)	0.22 (<0.001)
Quadratic				
ET	--	--	0.003 (0.320)	--
SS	0.002 (<0.001)	0.001 (0.003)	8.33 (0.988)	--
CHF	0.042 (<0.001)	0.008 (0.095)	-0.04 (<0.001)	--
Interactions				
ET*SS	--	--	0.001 (0.389)	0.0005 (0.007)
ET*CHF	-0.01 (0.003)	-0.01 (0.032)	-0.19 (0.012)	-0.02 (0.002)
SS*CHF	0.003 (0.008)	0.005 (0.007)	0.003 (0.213)	0.0003 (0.105)
R^2adj	0.94	0.83	0.77	0.87
CV (%)	6.63	8.70	4.55	5.60
p of F (model)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Lack of fit	0.19	0.87	0.90	0.08
Optimization				
Predicted values	5.68	8.22	30.22	1.67
True values	5.84 ± 0.21	8.5 ± 0.5	31.03 ± 0.84	1.62 ± 0.29

ET= extrusion temperature; SS= Screw speed; CHF= Chickpea flour content; CL= Cooking loss; CT= cooking time; TPC = Total phenolic compounds; Numbers within brackets indicate significance levels, dashes indicate terms of model non-used.

Cooking time (CT)

The effect of ET and CHF content on the CT of pasta at a constant level of SS = 117 rpm is presented in Figure 1c. The lowest CT values (< 7 min) occurred at high ET (> 120 °C) and high CHF (> 14 %). This could be related to starch structure modifications and the different structural organization of the amorphous matrix generated by the high ET, which resulted in a more rapid softening of the pasta matrix due to the water absorption, possibly mediated by the higher content of protein and dietary fiber (Marti *et al.*, 2010). This coincides with the behavior reported by Suo *et al.* (2022) who observed, in rice-based pasta, a decrease in CT from 11 to 7 min when increasing the chickpea flour content up to 75 %. Also, the effect of SS and CHF on the CT of pasta at a constant level of ET = 107 °C is presented in Figure 1d. The lowest CT values (< 8.5 min) occurred at medium to high SS values (117-144 rpm) in the entire CHF range. This behavior may be due to a higher gelatinization of the rice starch in these extrusion conditions, which formed a more compact structure, reducing the time for hydration. Wang *et al.* (2012) reported an increase in CT when increasing the SS and moisture content. These authors showed a positive correlation of this response with the expansion index and the percentage of gelatinized starch in pasta made from pea starch.

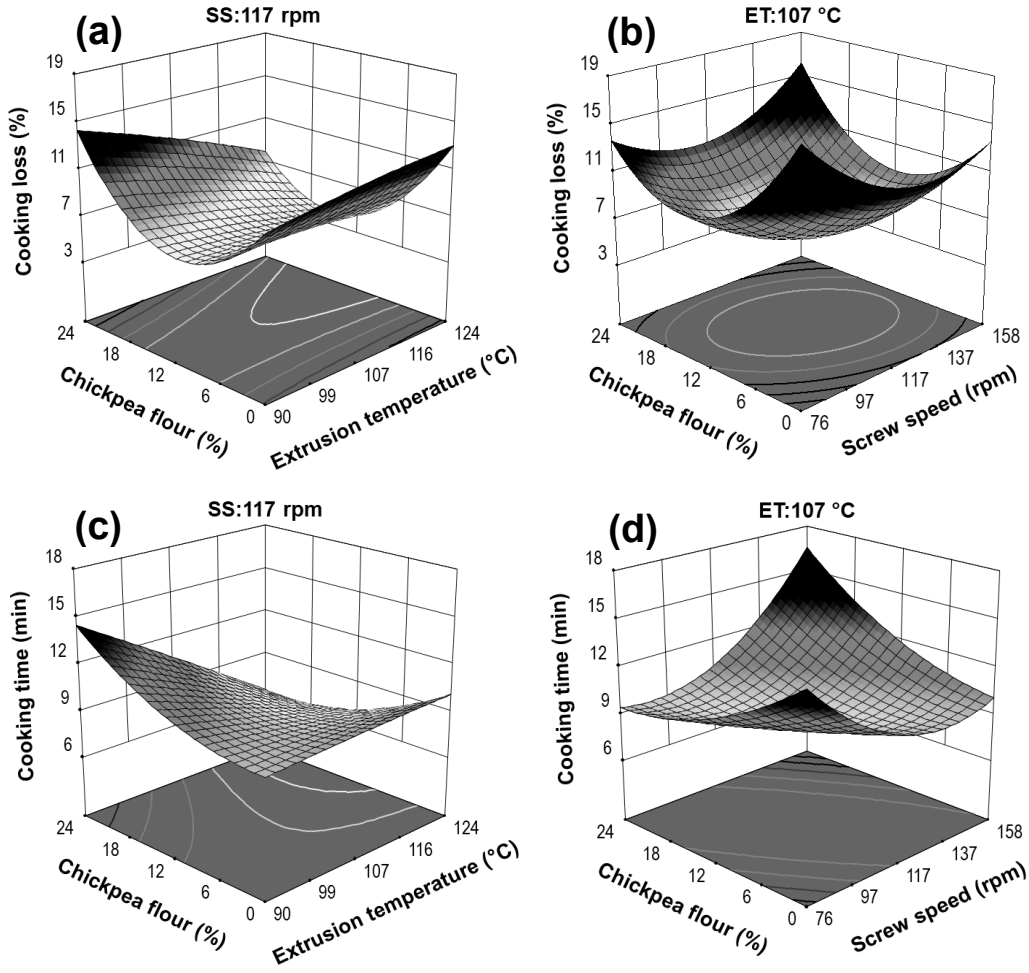


Figure 1. Effect of the extrusion temperature and the chickpea flour content on the cooking loss (a) and cooking time parameters (c); effect of the screw speed and the chickpea flour content on the cooking loss (b) and cooking time (d) parameters of gluten-free pasta.

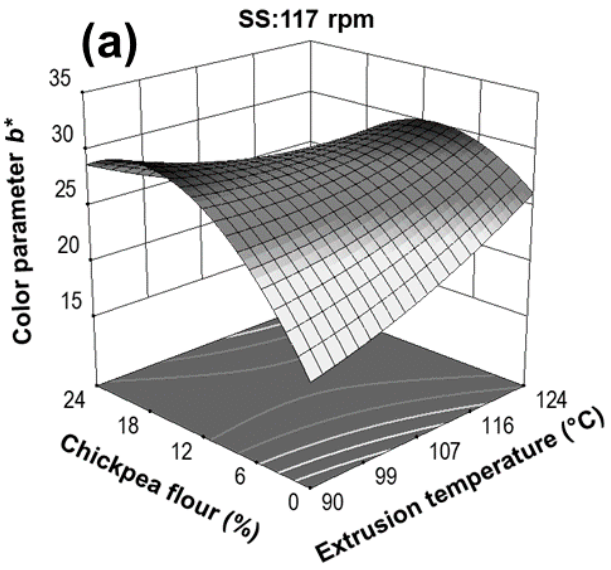
Figura 1. Efecto de la temperatura de extrusión y del contenido de harina de garbanzo sobre los parámetros pérdida de sólidos por cocción (a), y tiempo de cocción (c); efecto de la velocidad de tornillo y del contenido de harina de garbanzo sobre los parámetros pérdida de sólidos por cocción (b) y tiempo de cocción (d) de pastas sin gluten.

Color parameter *b

Color is a very important quality parameter for food consumers, and it is influenced by the raw materials used in the formulation of these materials (Coutinho *et al*., 2013). The effect of ET and CHF content on the color parameter *b** for GFP at a constant level of SS = 117 rpm is presented in Figure 2a. It can be observed that the highest *b** values (> 30) occurred at high CHF levels (10 - 21 %) in the entire range of ET. The high *b** values obtained may be due to the high levels of yellow pigments found in chickpea flour (*b** value = 19.40 ± 0.49), compared with rice flour (7.04 ± 0.25). The yellow pigmentation in chickpea may be due to the presence of the carotenoid compounds in this legume, mainly lutein and β-carotene (Kumar *et al*., 2020). Also, the decrease in the *b** values at high ET (> 116 °C) may be due to the Maillard reactions or caramelization that produced a darkening in the extruded samples. This behavior may also be due to oxidation by enzymes during the extrusion processing, where the lipoxygenases affect the yellow carotenoid pigments, decreasing their coloration (Belton and Taylor, 2010). Likewise, the effect of SS and CHF content on the color parameter *b** for pasta at a constant level of ET = 107 °C is presented in Figure 2b. It can be observed that the highest *b** values (> 30) occurred at high SS (> 131 rpm) and CHF contents (14-21 %). The high color *b** values at high SS could be due to the lower residence time of materials inside the extruder, diminishing the degradation of the yellow pigments in pasta due to the thermomechanical conditions. Also, the increase of *b** at high CHF contents is similar to the behavior reported by Udachan and Sahoo (2017), who observed that the *b** values increased from 17.91 to 28.62 in pasta where broken rice flour was replaced by defatted soy flour, being attributed to the greater yellow coloration of soy compared to the broken rice.

Total phenolic compounds (TPC)

The effect of ET and CHF on the TPC content in GFP at a



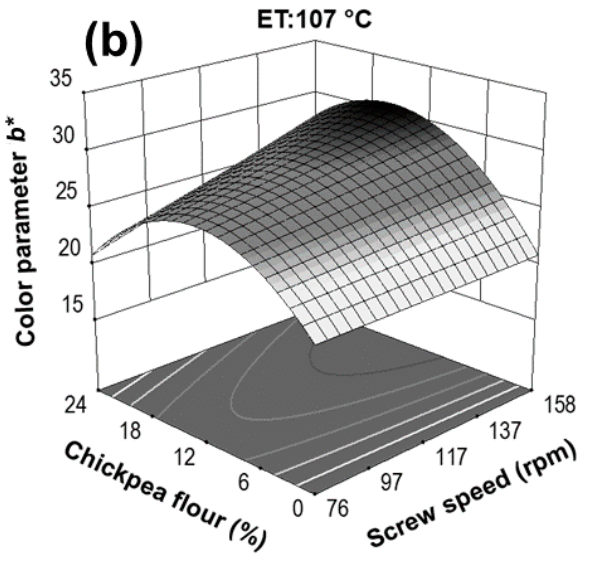
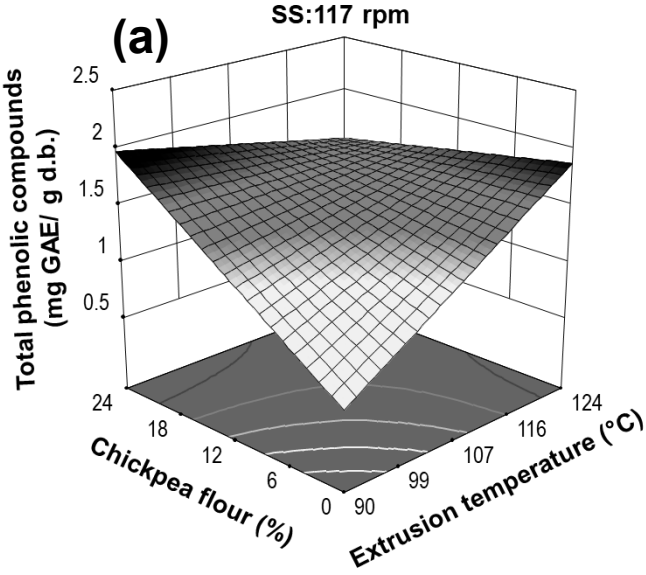


Figure 2. Effect of the extrusion temperature and the chickpea flour content (a), and effect of the screw speed and the chickpea flour content on the color parameter *b** (b) of gluten-free pasta.
Figura 2. Efecto de la temperatura de extrusión y del contenido de harina de garbanzo (a), y efecto de la velocidad de tornillo y del contenido de harina de garbanzo (b) sobre los valores del parámetro *b** de color de pastas sin gluten.



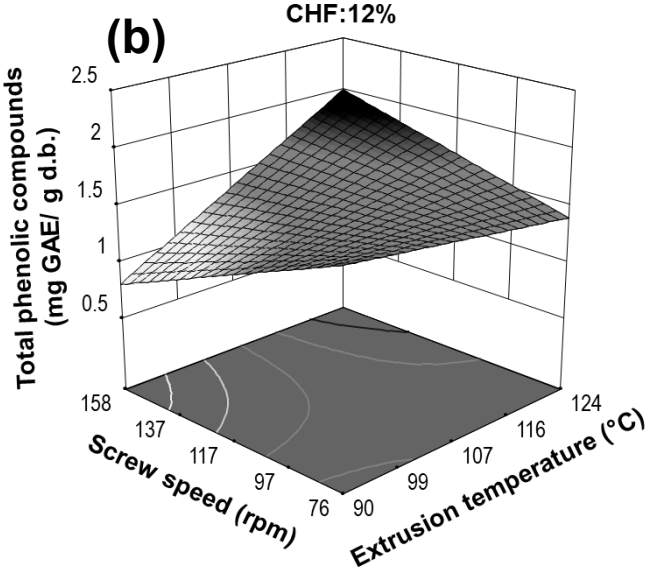


Figure 3. Effect of the extrusion temperature and chickpea flour content (a), and effect of the extrusion temperature and the screw speed (b), on the total phenolic compounds content of gluten-free pasta.
Figura 3. Efecto de la temperatura de extrusión y del contenido de harina de garbanzo (a), y efecto de la temperatura de extrusión y de la velocidad de tornillo (b) sobre el contenido de compuestos fenólicos totales de pastas sin gluten.

constant level of SS = 117 rpm is shown in Figure 3a. The highest TPC values (> 1.86 mg GAE/ g d.b.) were found in two zones, one by combining low ET (< 107 °C) and high CHF content (> 21 %). This behavior could be related to the high phenolic compounds content found in chickpea flour (8.68 ± 0.25 mg GAE/ g d.b.). This value was higher than that found in the broken rice flour (1.03 ± 0.33 mg GAE/ g d.b.) used in this study. Also, the high TPC content at high ET (> 120 °C) and low CHF (< 8 %) content may be due to the release of bound phenolic compounds from both, chickpea flour and broken rice flour, as a result of the increase in ET. Herrera-Cazares *et al.* (2021) reported the ability of the extrusion process to release phenolic compounds due to the combined effect of ET and shear stress, which allows their potential solubilization and bioaccessibility during the digestion process. Likewise, the effect of ET and SS on the TPC content of pasta at a constant level of CHF = 12 % is shown in Figure 3b. The highest TPC values (> 1.86 mg EAG/ g d.b.) were found at high SS (> 140 rpm) and high ET (>116 °C). This behavior could be attributed to the release of the bound phenolic compounds found mainly in rice flour due to the thermomechanical effect of SS (Gujral *et al.*, 2012). Also, the

high ET could lead to an enhancement in the extraction of phenolic compounds by the modification in macromolecules such as complex carbohydrates (soluble and insoluble fiber), altering the cellular structures that caused the release of phenolic compounds from the matrix (Samyor *et al.*, 2018).

Optimization

The optimization process was carried out to find the appropriate extrusion conditions to obtain the GFP with better physicochemical, phytochemical, and cooking properties. The criteria used for the optimization were lower CL and CT values, and higher TPC and color parameter *b** values. The optimal conditions obtained by numerical optimization were ET = 117 °C, SS = 134.4 rpm, and CHF content = 12.57 %, with predicted values by the experimental design for CL = 5.68 %, CT = 8.22 min, color *b** = 30.22, and TPC = 1.67 mg GAE/ g d.b. (Table 3). A global desirability value = 0.77 for the optimized conditions was obtained (Figure 4). According to Fabila-Carrera (1998), this desirability value is considered adequate.

The obtained experimental values for CL, CT, color *b**, and TPC were compared with the predicted values for the validation of the optimization. In the validation (Table 3), an experimental value of CL = 5.84 % was observed, which was lower than that found in a commercial rice pasta (CRP) (9.71 ± 0.2 %) and commercial wheat semolina pasta (CWP) (13.21 ± 0.12 %). Likewise, a value of CT = 8.5 min was obtained, which was lower than that found in CRP (11 ± 0.3 min) and CWP (12.5 ± 0.3 min). Also, a color *b** value = 31.03 was found, being lower than that found in the CWP (35 ± 0.92). Likewise, a TPC value of 1.62 mg GAE/ g d. b. was obtained, being higher than that found in CWP (0.6 ± 0.02 mg GAE/ g d. b.). Also, the results obtained in the validation were similar to the values predicted by the mathematical models. Therefore, the models used for each variable of response are valid to find the optimal extrusion processing conditions to obtain GFP with adequate physicochemical, phytochemical, and cooking properties.

Dietary fiber (DF)

DF values for raw and processed control pasta (CP) without chickpea, raw and processed optimized pasta (OP), and processed commercial rice pasta (CRP) are shown in Table 4. It can be observed that for CP and OP treatments, the values of total (TDF), insoluble (IDF), and soluble dietary fiber (SDF) were higher ($p < 0.05$) in the materials processed by extrusion compared with the unextruded mixture. The higher content of TDF and IDF after extrusion may be due to the formation of resistant starch, whereas the increase in SDF is associated with the formation of smaller, more soluble molecules due to the breaking of covalent and non-covalent bonds in carbohydrates and proteins (Menis-Henrique *et al.*, 2020). In addition, the OP showed higher TDF, IDF, and SDF levels ($p < 0.05$) concerning the CP. This behavior may be due to the higher TDF, IDF, and SDF levels (15.44 ± 0.14 %, 9.25 ± 0.06 %, and 6.19 ± 0.13 %, respectively) presented by the chickpea flour, in comparison to those of TDF, IDF, and SDF (2.26 ± 0.04 %, 1.36 ± 0.02 %, and 0.90 ± 0.01 %, respectively) shown by the broken rice flour was used for the production of the gluten-free pasta. Also, the lowest values were presented in the CRP.

Sensory analysis (SA)

The results of the general acceptability test for the gluten-free pasta (OP) obtained under optimal processing conditions (ET = 117 °C, SS = 134.4 rpm, and CHF = 12.57 %) are shown in Figure 5. Most of the panelists (29 %) answered "like slightly" (value 6 on the hedonic scale (HS)), being 11.5 % women and 17.5 % men. The sensory analysis results for the general

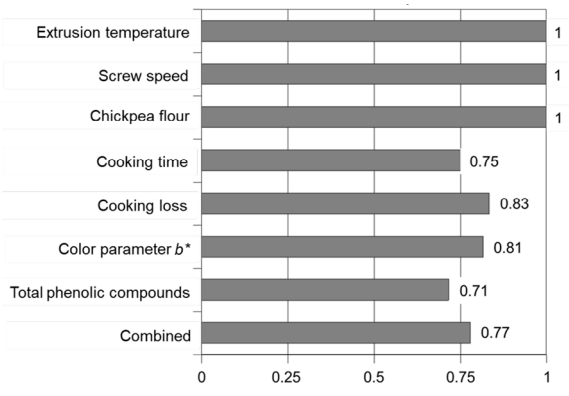


Figure 4. Individual and global desirability values for the response variables evaluated in gluten-free pasta during optimization of the extrusion process.
Figura 4. Valores de deseabilidad individual y global para las variables de respuesta evaluadas en pastas sin gluten durante la optimización del proceso de extrusión.

Table 4. Dietary fiber content of the control pasta and pasta obtained under optimal conditions, at the different processing stages (unextruded mixture (UM) and extruded pasta (EP)).
Tabla 4. Contenido de fibra dietaria de la pasta control (PC) y pasta obtenida bajo condiciones óptimas de procesamiento (PO) en las diferentes etapas de procesamiento (mezcla sin extrudir (MSI) y pasta extrudida (PE)).

Product	Processing stages	Dietary fiber (%, db)		
		Insoluble dietary fiber (IDF)	Soluble dietary fiber (SDF)	Total dietary fiber (TDF)
Control pasta (CP)	Unextruded mixture (UM)	1.39±0.19^{b}	1.01±0.32^{b}	2.40±0.51^{b}
	Extruded pasta (EP)	1.75±0.28^{a}	1.55±0.15^{a}	3.30±0.43^{a}
Optimal pasta (OP)	Unextruded mixture (UM)	3.76±0.13^{b}	2.18±0.05^{b}	5.94±0.18^{b}
	Extruded pasta (EP)	4.10±0.22^{a}	3.86±0.14^{a}	7.96±0.36^{a}
Commercial rice pasta		0.65±0.12	0.41±0.22	1.06±0.34

Data are presented as mean ± standard deviation, the dietary fiber values with different superscript letters in each column for the CP and OP products when comparing the different processing stages (UM and EP) are significantly different (LSD test. $p < 0.05$).

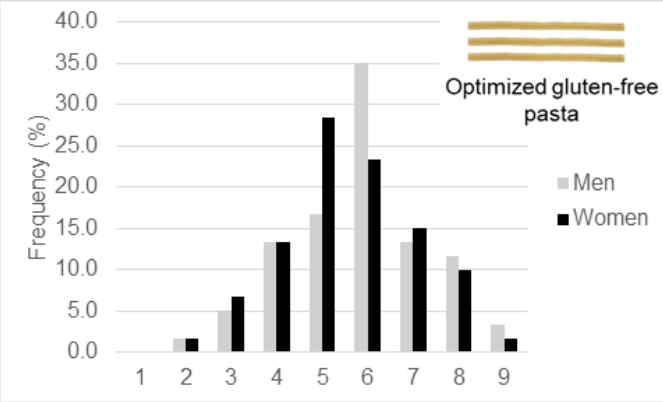


Figure 5. Frequency analysis in the general acceptability test (1 = dislike extremely, 2 = dislike very much, 3 = dislike moderately, 4 = dislike slightly, 5 = neither like nor dislike. 6 = like slightly, 7 = like moderately, 8 = like very much, 9 = like extremely) in the sensory analysis of the optimized gluten-free pasta (OP).

Figura 5. Análisis de frecuencia en la prueba de aceptabilidad general (1 = Me disgusta extremadamente, 2 = Me disgusta mucho, 3 = Me disgusta moderadamente, 4 = Me disgusta ligeramente, 5 = Ni me gusta ni me disgusta, 6 = Me gusta ligeramente, 7 = Me gusta moderadamente, 8 = Me gusta mucho, 9 = Me gusta extremadamente) en el análisis sensorial de la pasta sin gluten optimizada (PO)

acceptability test showed that approximately 79.2 % of the panelists indicated a degree of acceptance ≥ 5 of the HS. The mean comparison test of the optimized pasta (OP) indicated that there was no statistically significant difference ($p < 0.05$) in the general acceptability of gluten-free pasta between men and women. Also, in the commercial rice pasta (CRP), the sensory analysis results showed that approximately 81.4 % of the panelists indicated a degree of acceptance ≥ 5 of the HS. The general acceptability results in CRP were slightly higher than those obtained in OP. However, the general acceptability results obtained in the OP made from broken rice and chickpea flour can be considered positive, in addition to obtaining a gluten-free pasta, whose consumption could reduce the problem of celiac disease among the population.

CONCLUSIONS

It is possible to obtain gluten-free pasta with adequate physicochemical, phytochemical, and cooking properties using the extrusion process, and employing broken rice and chickpea flour as raw materials. The addition of chickpea flour allowed us to obtain pasta with better nutritional/ nutraceutical properties, since its addition increased phenolic compounds, proteins, and dietary fiber content. Furthermore, gluten-free pasta was obtained with sensory properties similar to commercial pasta. Also, using broken rice to produce gluten-free pasta could reduce the waste of this material, which is a rice milling by-product. The consumption of pasta is an alternative for consumers with celiac disease because this food is gluten-free and has appropriate quality characteristics, whose consumption could eventually have benefits on human health.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Universidad Autónoma de Sinaloa through "Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación" (PROFAPI-2022, PRO_A7_018). Authors thank to CONAHCYT for the financial support given for the doctoral studies of M. Sc. Samuel Arturo Delgado Murillo.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

AACC. 2000. Method 16-50. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th ed. St. Paul, MN.

Adom, K.F. and Liu, R.H. 2002**.** Antioxidant activity of grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(21): 6182-6187.

AOAC. 2012. Official methods of analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. 19th Ed. Gauthersburg, Maryland, USA.

Belton, P. and Taylor, J. 2010. Pseudocereals and Less Common Cereals – Grain Properties and Potential Utilization. Berlin, Germany: *Springer*.

Bolarinwa, I. F. and Oyesiji, O.O. 2021. Gluten free rice-soy pasta: proximate composition, textural and sensory attributes. Heliyon. 7(1): e06052.

Bouasla, A. and Wójtowicz, A. 2021. Gluten-Free Rice Instant Pasta: Effect of Extrusion-Cooking Parameters on Selected Quality Attributes and Microstructure. Processes. 9(4): 693.

Bresciani, A., Pagani, M.A. and Marti, A. 2022. Pasta-making process: a narrative review on the relation between process variables and pasta quality. Foods. 11(3): 256.

Chávez-Ontiveros, J., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Torres, G.I., Figueroa-Salcido, O.G., Arámburo-Gálvez, J.G., Montoya-Rodríguez, A., Ontiveros, N. and Cuevas-Rodríguez, E.O. 2022. Extrusion improves the antihypertensive potential of a kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysate. *Foods*. 11(17): 2562.

Coutinho, L.S., Batista, J.E.R., Caliari, M. and Soares Júnior, M.S. 2013. Optimization of extrusion variables for the production of snacks from by-products of rice and soybean. Food Science and Technology. 33(4): 705-712.

D'egidio, M.G., Mariani, B.M., Nardi, S., Novaro, P. and Cubadda, R. 1990. Chemical and technological variables and their relationships: A predictive equation for pasta cooking quality. Cereal Chemistry. 67(3): 275-281.

Fabila-Carrera, G. 1998. Design and analysis of industrial experiments. *Universidad Iberoamericana* (pp. 19-29). México, D. F.

Feizollahi, E., Mirmoghtadaie, L., Mohammadifar, M. A., Jazaeri, S., Hadaegh, H., Nazari, B. and Lalegani, S. 2018. Sensory, digestion, and texture quality of commercial gluten-free bread: Impact of broken rice flour type. Journal of Texture Studies. 49(4): 395-403.

Foschia, M., Peressini, D., Sansidoni, A., Brennan, C.S. 2013.The effects of dietary fibre addition on the quality of common cereal products. Journal of Cereal Science, 58(2):216-227. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.010.

García-Almeida, J., García-Alemán, J., Martínez-Alfaro, B., Vilchez-López, F.J. and Maraver-Selfa, S. 2012. Enfermedad celiaca. Dieta controlada en gluten. Capítulo 16. En: Dietoterapia, nutrición clínica y metabolismo. (Eds). *Edic. Díaz de Santos*. Madrid.

Granito, M., Pérez, S. and Valero, Y. 2014 Calidad de cocción, aceptabilidad e índice glicémico de pasta larga enriquecida con leguminosas. Revista Chilena de Nutrición. 41(4): 425-432.

Gujral, H.S., Sharma, P., Kumar, A. and Singh, B. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of extruded brown rice. International Journal of Food Properties. 15(2): 301-311.

Herrera-Cazares, L.A., Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A.K., Gutiérrez-Uribe, J.A., Campos-Vega, R. and Gaytán-Martínez, M. 2021. Influence of extrusion process on the release of phenolic compounds from mango (*Mangifera indica* L.) bagasse-added confections and evaluation of their bioaccessibility, intestinal permeability, and antioxidant capacity. Food Research International. 148: 110591.

Heimler, D., Vignolini, P., Giulia, D.M., Vincieri, F.F., and Romani, A. 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties, Food Chemistry. 99(3):464-469. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.057.

Hoseney, R. C. 1999. Principles of Cereal Science and Technology, pp. 32-65, 269-274. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.

Jalgaonkar, K., Jha, S.K., Mahawar, M.K. and Yadav, D.N. 2019. Pearl millet based pasta: Optimization of extrusion process through response surface methodology. Journal of Food Science and Technology. 56(3): 1134-1144.

Kumar, P., Yadav, S. and Singh, M.P. 2020. Possible involvement of xanthophyll cycle pigments in heat tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 26: 1773-1785.

Lim, J. 2011. Hedonic scaling: A review of methods and theory. Food Quality and Preference. 22(8): 733-747.

Marti, A., Seetharaman, K. and Pagani, M. A. 2010. Rice-based pasta: A comparison between conventional pasta-making and extrusion-cooking. Journal of Cereal Science. 52(3): 404-409.

Menis-Henrique, M.E.C., Scarton, M., Piran, M.V.F. and Clerici, M.T.P.S. 2020. Cereal fiber: Extrusion modifications for food industry. Current Opinion in Food Science. 33: 141-148.

Myers R. and Montgomery, D. 1995. Response surface methodology: Process and product optimization using design experiments. New York: Wiley Interscience Publications.

Padalino, L., Mastromatteo, M., Lecce, L., Spinelli, S., Conte, A. and Alessandro Del Nobile, M. 2015. Optimization and characterization of gluten-free spaghetti enriched with chickpea flour. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 66(2): 148-158.

Qin, W., Lin, Z., Wang, A., Chen, Z., He, Y., Wang, L., Liu, L., Wang, F. and Tong, L.T. 2021. Influence of particle size on the properties of rice flour and quality of gluten-free rice bread. LWT. 151: 112236.

Romano, A., Ferranti, P., Gallo, V. and Masi, P. 2021. New ingredients and alternatives to durum wheat semolina for a high quality dried pasta. Current Opinion in Food Science. 41: 249-259.

Saget, S., Costa, M., Barilli, E., de Vasconcelos, M.W., Santos, C.S., Styles, D. and Williams, M. 2020. Substituting wheat with chickpea flour in pasta production delivers more nutrition at a lower environmental cost. Sustainable Production and Consumption. 24: 26-38.

Samyor, D., Deka, S. C. and Das, A.B. 2018. Effect of extrusion conditions on the physicochemical and phytochemical properties of red rice and passion fruit powder based extrudates. Journal of Food Science and Technology. 55: 5003-5013.

Sofi, S. A., Singh, J., Mir, S. A. and Dar, B.N. 2020. In vitro starch digestibility, cooking quality, rheology and sensory properties of gluten-free pregelatinized rice noodle enriched with germinated chickpea flour. LWT. 133: 110090.

Stat-Ease. 2018. Desing-expert (Version 11.0). Minneapolis, MN, USA.

Suo, X., Dall'Asta, M., Giuberti, G., Minucciani, M., Wang, Z. and Vittadini, E. 2022. The effect of chickpea flour and its addition levels on quality and in vitro starch digestibility of corn–rice-based gluten-free pasta. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 73(5): 600-609.

Torres, A., Frias, J., Granito, M. and Vidal-Valverde, C. 2007. Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. Food Chemistry. 101(1): 202-211.

Udachan, I. and Sahoo, A. K. 2017. Quality evaluation of gluten free protein rich broken rice pasta. Journal of Food Measurement and Characterization. 11: 1378-1385.

Wang, N., Maximiuk, L. and Toews, R. 2012. Pea starch noodles: Effect of processing variables on characteristics and optimization of twin-screw extrusion process. Food Chemistry. 133(3): 742-753.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias nativas cultivables procedentes de minas abandonadas en Tacna, Perú

Isolation and phylogenetic characterization of cultivable native bacteria from abandoned mines in Tacna, Peru

César Julio Cáceda Quiroz[1]* ✉, Gisela July Maraza Choque[1]✉, Dina Mayumi Chachaque Callo[1]✉, Gabriela de Lourdes Fora Quispe[1]✉, Diana Galeska Farfan Pajuelo[1]✉, Milena Carpio Mamani[1]✉

[1] Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Biología-Microbiología, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Av. Cusco s/n, Tacna 23004, Perú.

RESUMEN

Las bacterias nativas adaptadas a ambientes contaminados han demostrado su gran capacidad de sobrevivir en condiciones adversas. El objetivo de este estudio fue identificar las bacterias presentes en suelos de minas abandonadas, además de investigar las relaciones filogenéticas de estas bacterias nativas cultivables. Se realizó el aislamiento bacteriano, la extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación del gen 16S ARNr, reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) con RaXML, e identificación de géneros relacionadas con microreact. Las secuencias obtenidas fueron editadas a un tamaño de 1200 – 1400 pb, que posteriormente se compararon con 1137 secuencias procedentes de la base de datos del GenBank. Los nueve aislamientos obtenidos se agruparon filogenéticamente en seis grupos que corresponderían a los géneros *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Peribacillus*, *Acinetobacter*. Por lo tanto, se resalta el potencial inexplorado de estas bacterias para ser utilizadas en procesos de biorremediación. Además, algunas de estas bacterias pueden ser propuestos como indicadores de contaminación, lo que amerita realizar una investigación más detallada debido a que estos microorganismos pueden ser empleados en futuras investigaciones.

Palabras clave: Bacteria nativa, Minas abandonadas, Contaminación de suelos, Reconstrucción filogenética, Biorremediación.

ABSTRACT

Native bacteria adapted to contaminated environments have demonstrated their remarkable survival ability under adverse conditions. This study aimed to identify bacteria present in soils from abandoned mines and to investigate the phylogenetic relationships of these cultivable native bacteria. Bacterial isolation, DNA extraction, PCR amplification, 16S rRNA gene sequencing, Maximum Likelihood phylogenetic reconstruction using RaXML, and identification of related genera using microreact, were conducted. The obtained sequences were edited to a 1200 – 1400 bp size, and subsequently compared with 1137 sequences from the GenBank database. The nine obtained isolates were phylogenetically grouped into six clusters corresponding to the genera *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Peribacillus*, and *Acinetobacter*. Thus, the unexplored potential of these bacteria for use in bioremediation processes is highlighted. Additionally, some of these bacteria may be proposed as pollution indicators, warranting further detailed investigation as these microorganisms could be employed in future research endeavors.

Keywords: Native bacteria, Abandoned mines, Soil contamination, Phylogenetic reconstruction, Bioremediation.

INTRODUCCIÓN

Las minas abandonadas o inactivas son un problema a nivel global, que representan una amenaza potencial para la salud y el ambiente (Candeias *et al.*, 2019). Durante los procesos extractivos, es común que se generen residuos mineros que permanecen en el suelo (Ali y Khan, 2017), estos desechos exhiben la capacidad de ser transportadores de contaminantes, pudiendo ingresar a la cadena alimentaria (Wuana y Okieimen, 2011; Bini *et al.*, 2017), este fenómeno puede ocasionar perturbaciones en el entorno del ecosistema.

A nivel mundial, se estima que existen más de un millón de minas abandonadas, incluidos pozos, socavones y minas aluviales en funcionamiento (Coelho y Teixeira, 2011). Específicamente en las explotaciones de cobre, se realizan comunmente a tajo abierto, generando grandes cantidades de desechos. La producción de una tonelada de cobre, requieren más de 150 toneladas de mineral, las cuales son sometidas a procesos de excavación, trituración, flotación y extracción mediante diferentes métodos que dependen de la naturaleza del material (Rzymski *et al.*, 2017). La extracción de azufre, está condicionada por la profundidad del yacimiento, resultando en un impacto ambiental perjudicial, típicamente manifestado como la acidificación del suelo (Tabak *et al.*, 2020). De estos factores surge a la necesidad de recuperar los terrenos mineros abandonados, un desafío que en algunos casos resulta ser extraordinariamente compleja (Favas *et al.*, 2018).

Desde esta perspectiva, se han desarrollado metodologías orientadas a mejorar y desarrollar una gestión eficiente de los desechos mineros (Agboola *et al.*, 2020), con la finalidad de mitigar y atenuar el impacto generado en el ambiente. En este enfoque, los microorganismos son los más

*Autor para correspondencia: César Julio Cáceda Quiroz
Correo-e:ccacedaq@unjgb.edu.pe
Recibido: 16 de agosto de2023
Aceptado: 10 de febrero de 2024
Publicado: 4 de marzo de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2130

utilizados para desintoxicar una gran cantidad de contaminantes a través de su actividad metabólica (Liu *et al.*, 2021; Bala *et al.*, 2022).

Las bacterias presentes en el suelo desempeñan un rol importante en el mantenimiento de la dinámica ecológica (Fernandes *et al.*, 2018). Además, se puede encontrar especies bacterianas aún no caracterizadas, que habitan en sitios contaminados (Altimira *et al.*, 2012; Salam y Varma, 2019), las cuales poseen la capacidad de convertir los desechos en valiosos recursos biológicos (Kumar y Gopal, 2015), resistir el estrés ambiental a través de la mutación y evolución, permitiéndoles sobrevivir en una amplia diversidad de áreas y condiciones ambientales (Jiang *et al.*, 2020). Estos microorganismos autóctonos son un grupo de consorcios microbianos innatos que habitan en el suelo (Jan *et al.*, 2020), y resultan altamente beneficiosos en aplicaciones de biolixiviación, biodegradación, biofertilizante, *natural farming*, y biocompostaje, generando beneficios económicos, sociales y de protección ambiental (Kumar y Gopal, 2015; Kapahi y Sachdeva, 2019; Verma y Kuila, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Su empleo puede aumentar la eficiencia en los procesos de biorremediación, debido a su gran potencial para sobrevivir en diversos ambientes y puede evitar impactos ecológicos impredecibles asociados con la introducción de organismos no nativos (Bôto *et al*., 2021). En este sentido, es necesario comprender la diversidad bacteriana en ambientes específicos, debido que permiten comprender la complejidad de estos sistemas (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

El gen 16S rRNA se usa ampliamente en filogenia bacteriana (Hassler *et al.*, 2022), este análisis de secuencias facilita la identificación de cepas raramente aisladas, y puede conducir al reconocimiento de nuevos patógenos y bacterias no cultivables (Clarridge, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que las plataformas de secuenciación de lectura corta, de las regiones variables del gen 16S rRNA no pueden lograr la resolución taxonómica que ofrece la secuenciación del gen completo (~ 1500 pb) (Johnson *et al.*, 2019) a pesar de ser un método de identificación rápido y preciso para aislados bacterianos, no es aplicable para varios géneros y solo proporcionan identificación hasta el nivel de Género (Raina *et al.*, 2019). Por otra parte, es importante entender las relaciones filogenéticas de las bacterias (Woese, 1987), debido a que genéticamente pueden estar relacionadas por similitudes en aspectos de funcionalidad. Los genomas bacterianos pueden contener rastros de una historia evolutiva compleja, que incluye una extensa recombinación homóloga, pérdida, duplicación y transferencia horizontal de genes (Zhou *et al.*, 2020). Además, aún no se han estudiado a profundidad las bacterias que están asociados a suelos contaminados por metales pesados.

Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo identificar bacterias presentes en suelos contaminados en minas abandonadas, así como investigar sus relaciones filogenéticas de las bacterias nativas cultivables, con la posibilidad de emplearse en procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en las minas abandonadas ubicadas en las provincias de Candarave (17° 3′ 1″ LS y 70° 10′ 3.5″ LW) y Palca (17° 46′ 45.4″ LS y 69° 51′ 57.0″ LW) en el departamento Tacna, Perú. Estas instalaciones minereas realizaban la extracción de azufre y cobre respectivamente, y los pasivos ambientales que se analizo se encontró contaminación por arsénico, plomo y cianuro libre (Cáceda *et al.*, 2022).

Para el aislamiento bacteriano se realizó un muestreo aleatorio compuesto en cinco puntos por cada área de investigación, las muestras de residuos mineros se recolectaron a una profundidad de 0 - 15 cm, luego se almacenó y selló en bolsas de plástico de primer uso para luego ser transportadas al laboratorio de biorremediación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento bacteriano, se pesó 100 g de cada muestra de residuo minero y se agregó en un matraz de un litro que contenía 200 mL de agua destilada estéril, posteriormente se homogenizó a 150 rpm a temperatura ambiente durante 1 h, luego se transfirió 10 mL del sobrenadante en 90 mL del medio Infusión Cerebro Corazón (ICC), que se incubó a 30 °C por 24 h (Restrepo *et al*., 2006; Kandasamy *et al*., 2015; Khamar et *al*., 2015). Finalmente, se sembró en placas con Agar Tripticasa Soya (ATS) y las bacterias fueron criopreservadas a - 80 °C en Caldo Tripticasa Soya (CTS) con 30 % de glicerol.

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit ADN bacteriano *innuPREP* (AnalytikJena, 2017), posteriormente para la amplificación por PCR se utilizaron *primers* universales *forward* 27F 5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′ y *reverse* 1492R 5′ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3′ (Hou *et al.*, 2018); para la reacción de PCR se utilizó con un volumen final de 25 µL, que incluye Buffer 10x (2.5 µL), 50 mM $MgCl_2$ (1 µL), 2 mM, dNTP's (2.5 µL), 10 nM primers (1 µL), 5U μL^{-1} Taq DNA polimerasa (0.20 µL) (Invitrogen), 8 ng de ADN que fueron cuantificados utilizando un fluorómetro Qubit 4 (Life Technologies, EE. UU.) y se completó con agua ultra pura, las condiciones de reacción fueron las siguientes: a 96 °C por 4 min, y 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, y extensión de 1 min a 71 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C (Dos Santos *et al.*, 2019). La cuantificación de ADN se realizó utilizando Qubit y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, los que contenían bandas visibles se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen, Seúl-Corea del Sur.

Análisis de datos

Las secuencias de ADN fueron alineadas y ensambladas mediante el software MEGA v6.0 y posteriormente la identificación taxonómica se realizó comparándolo con la base de datos del GenBank, del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Informa-

tion-NCBI), usando la herramienta BLASTN. Se consideraron sólo aquellas secuencias que presentaban un porcentaje de identidad superior a 94 % con la secuencia sometida. La reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud (*máximum likelihood*) se realizó mediante el programa RaXML y la identificación de géneros relacionados con el programa microreact.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular y reconstrucción filogenética

En este estudio, todas las secuencias obtenidas fueron editadas a un tamaño de 1200 a 1400 pb. Posteriormente se realizó una búsqueda en la base del GenBank y se realizó la comparación de secuencias de nucleótidos mediante un Blast que reveló porcentajes de identidad superior al 94%. Para la reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud se utilizó una metadata conformada por 1137 secuencias (Tabla 1, Figura 1) que incluyeron 116 géneros bacterianos.

Las cepas B1, B2, B4, B3, B5, B6, B9, B10, B11 fueron aislados de residuos mineros contaminados con arsénico, plomo y cinauro libre (Cáceda *et al*., 2022), estas bacterias se agruparon en 6 grupos que corresponde a los géneros *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Peribacillus* y *Acinetobacter* (Figura 2), lo que indica su capacidad de sobrevivir, adaptarse y proliferarse en entornos adversos afectados por la contaminación, y podrían transformar los residuos en recursos biológicos valiosos (Kumar y Gopal, 2015), desempeñando un papel crucial en este tipo de hábitats, que podría aumentar la eficiencia en los procesos de biorremediación (Guo *et al*., 2010; Kumar y Gopal, 2015; Vaishnavi *et al*., 2019; Amrane *et al*., 2020).

El análisis filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud (ML), indica que la cepa B1 está estrechamente relacionada con el género *Paenibacillus*, la cepa B4 con *Peribacillus*, las cepas B2, B6, B9, B5 con el género *Bacillus*, la cepa B3 esta relacionado con el género *Cytobacillus*, B10 con el género *Microbacterium* y la cepa B11 al género de *Acitenobacter* (Figura 3). Lo que sugiere que los taxones comparten características ecológicas y rasgos funcionales (Morrissey *et al*., 2016). El gen 16S ARNr comúnmente se utiliza para investigar la filogenia y la taxonomía bacteriana, proporcionando identificación a nivel de género y especie, la falta de una definición cuantitativa consensuada de género o especie dificulta la identificación a nivel de especie. En la mayoría de los casos, la identificación de géneros supera el 90% (Janda y Abbott, 2007), pero surgen dificultades debido a la similitud genética entre individuos que varía del 92% al 99% (Pereira *et al*., 2020), complicando la identificación precisa a nivel de especie (Clarridge, 2004).

Table 1. Identification of the strains
Tabla 1. Identificación de las cepas

Cepa	Identifiación	Cobertura (%)	Identidad (%)	Accesion
B1	*Paenibacillus*	100	99.56	FR849920.1
B2	*Bacillus*	100	99.85	NR_118996.1
B3	*Cytobacillus*	100	99.85	NR_112635.1
B4	*Peribacillus*	100	100	NR_117474.1
B5	*Bacillus*	99	100	NR_115526.1
B6	*Bacillus*	100	100	NR_074540.1
B9	*Bacillus*	100	100	NR_113266.1
B10	*Microbacterium*	100	94.07	OP351504.1
B11	*Acitenobacter*	99	99.86	NR_113346.1

Lista de géneros bacterianos identificadas a nivel molecular, mediante amplificación por PCR del gen ARN 16S, provenientes de muestras de suelos de minas abandonadas, en la provincia de Tacna, Perú.

Especificamente el género *Bacillus* alberga aproximadamente 293 especies/subespecies, constituyen un grupo filogenéticamente incoherente (Patel y Gupta, 2020), además basado en el marco filogenético, la genómica comparativa y las características morfológicas, algunas especies se han separado del género *Bacillus* y se han asignado a nuevos géneros. Ademas, las relaciones entre individuos de una misma especie o género se actualizan periódicamente, proponiendo la transferencia de especies de estos clados a nuevos géneros de *Bacillus* como son: *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus* y *Peribacillus Cytobacillus*, *Mesobacillus*, *Neobacillus*, *Metabacillus* y *Alkalihalobacillus* (Starostin *et al*., 2015; Jiang *et al*., 2021), que representan un paso importante hacia la clarificación de la filogenia y taxonomía del género *Bacillus*. Estos géneros tienden a formar clados en el árbol filogenético, algunos basados en secuencias concatenadas para grandes conjuntos de proteínas diferenciadas de otras especies de *Bacillaceae* (Patel y Gupta, 2020).

En el caso del género *Bacillus*, se han realizado investigaciones en biotecnología, considerándolos agentes potencialmente activos y eficaces para la eliminación de diversos metales tóxicos presentes en el ambiente (Alotaibi *et al*., 2021; Arce-Inga *et al*., 2022). Las investigaciones realizadas por Zahoor y Rehman (2009), Guo *et al.* (2010), Gupta *et al.* (2010) así como Ayangbenro y Babalola (2020), aislaron *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. sterothermophilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. jeotgalim* de ambientes contaminados demostrando tolerancia a metales pesados con capacidad para ser utilizados en procesos de biorremediación. Investigaciones realizadas por Ran *et al.* (2020) identificaron a *Bacillus safensis* de un suelo de mina contaminada por manganeso (Mn) y Mekuto *et al.* (2016) identificaron a *Bacillus marisflavi*, que tuvo la capacidad de crecer en medios que contienen CN^- y SCN^-.

Para *Acinetbobacter* sp., en investigaciones realizadas por Bazzi *et al.* (2020), Cai *et al.* (2021), Dhakephalkar y Chopade (1994), Irawati *et al.* (2021), Méndez *et al.* (2017), Nagvenkar y Ramaiah (2010), Pande *et al.* (2022) y Sevak *et al.* (2023) reportaron a *Acinetobacter radioresistens*, *Acineto-*

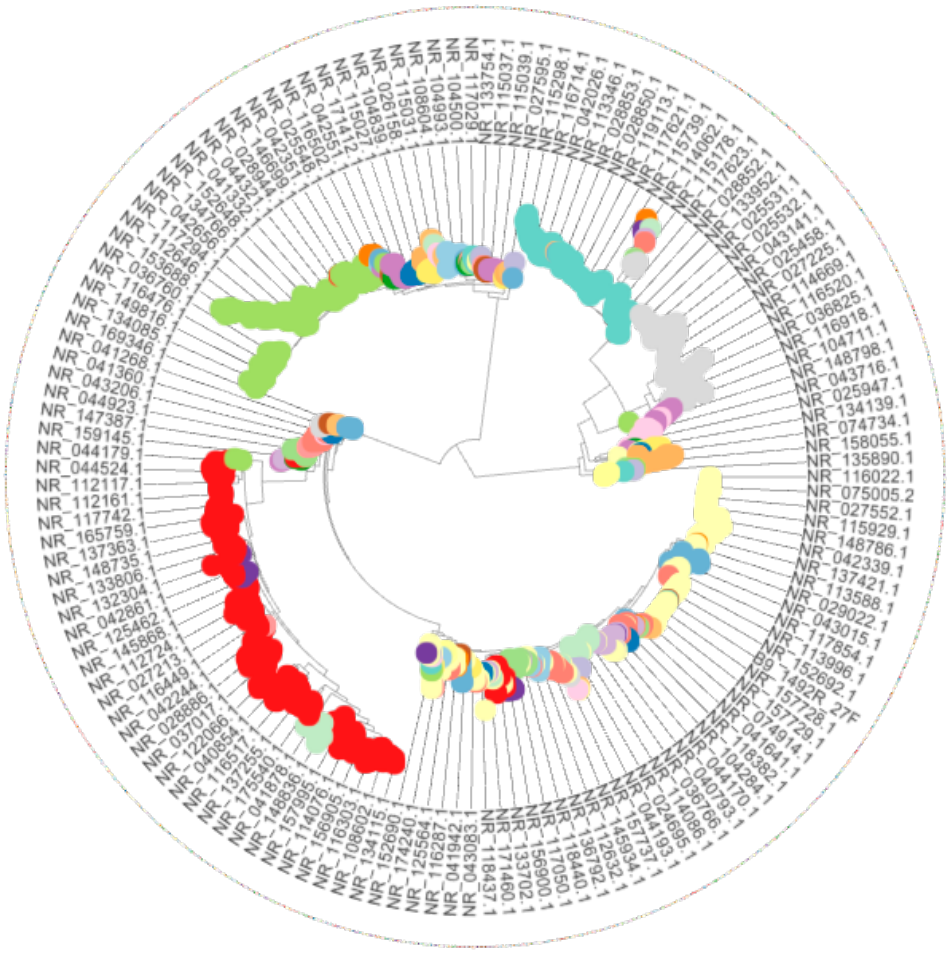


Figure 1. Phylogenetic reconstruction of maximum likelihood tree from 1137 sequences of the 16S rRNA gene.
Figura 1. Reconstrucción filogenética de árbol de máxima verosimilitud a partir 1137 secuencias del gen ARNr 16S.

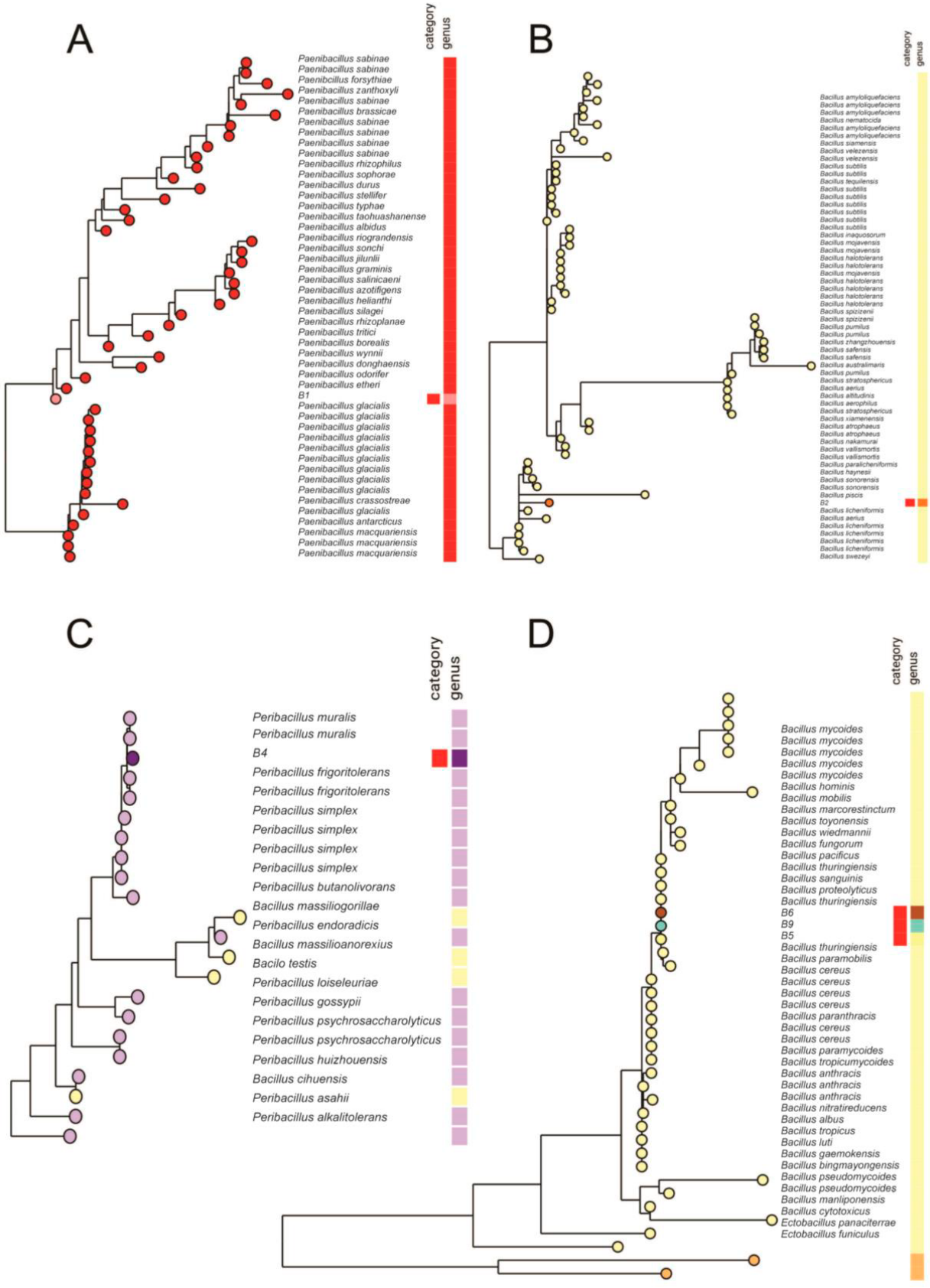
bacter calcoaceticus, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. junii*, *A. lwoffii* y *A. johnsonii*, que fueron utilizados en procesos de biorremediación para extraer y detoxificar metales pesados transformando compuestos tóxicos como As, Cu, Cr, Hg, y Ag en sustancias menos tóxicas. Además, se ha demostrado la capacidad de este género para biodegradar hidrocarburos totales de petroleo, produciendo biosurfactantes en agua y suelo contaminando (Ortega *et al.*, 2018). *Acinetobacter venetianus* ha demostrado la capacidad de degradar alcanos (Mahjoubi *et al.*, 2013; Jung y Park, 2015; Nutman *et al.*, 2016; Méndez *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2021).

Para el género *Paenibacillus* se han identificado a *Paenibacillus polymyxa, Paenibacillus dendritiformis, Paenibacillus validus*, *Paenibacillus alba* han mostrado potencial de eliminar metales pesados e hicrocarburos (Rawat y Rai, 2012; Çolak *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019; Dawwam *et al.*, 2023).

Además en investigaciones realizadas por Agarry *et al.* (2010), Onuoha (2014), Grady *et al.* (2016), Shibulal *et al.* (2017) y Sernaque *et al.* (2019), mencionaron que *Paenibacillus* spp. fué aislado de suelos contaminados.

En el caso del género *Peribacillus*, se han reportado 15 especies aisladas de muestras de suelo (Jiang *et al.*, 2021). En el caso de *Peribacillus frigoritolerans* tiene la capacidad de degradar algunos plásticos (Wufuer *et al.*, 2022).

Se conocen más de 90 especies de *Microbacterium*; en investigaciones realizadas por Corretto *et al.* (2020) aislaron 70 microbacterias, pertenecientes a 20 especies diferentes (entre ellas: *M. azadirachtae*, *M. hydrocarbonoxydans*, *M. pumilum*, *M. oxydans*, etc.) en suelos contaminados con zinc, plomo y cadmio; Sheng *et al.* (2008), Aniszewski *et al.* (2010) y Learman *et al.* (2019), aislaron 16 cepas diferentes de microbacterias de suelo presentes en suelo minero contaminado. Según Corretto *et al.* (2015) indican que varias especies de microbacterias han demostrado ser resistentes a diferentes metales pesados. Además, Salam *et al.* (2014) reportaron especies de este género que son capaces de tolerar y mantenerse viables en suelos contaminados con hidrocarburos, altas concentraciones de metales pesados y con capacidad de degradar el antraceno. También *Microbacterium terregenes* está involucrado en la degradación del fenol (Abdel-Razek *et al.*, 2015).


A
category
genus
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus sabinae
Paenibcillus forsythiae
Paenibacillus zanthoxyli
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus brassicae
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus sabinae
Paenibacillus rhizophilus
Paenibacillus sophorae
Paenibacillus durus
Paenibacillus stellifer
Paenibacillus typhae
Paenibacillus taohuashanense
Paenibacillus albidus
Paenibacillus riograndensis
Paenibacillus sonchi
Paenibacillus jilunlii
Paenibacillus graminis
Paenibacillus salinicaeni
Paenibacillus azotifigens
Paenibacillus helianthi
Paenibacillus silagei
Paenibacillus rhizoplanae
Paenibacillus tritici
Paenibacillus borealis
Paenibacillus wynnii
Paenibacillus donghaensis
Paenibacillus odorifer
Paenibacillus etheri
B1
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus crassostreae
Paenibacillus glacialis
Paenibacillus antarcticus
Paenibacillus macquariensis
Paenibacillus macquariensis
Paenibacillus macquariensis
B
category
genus
Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus nematocida
Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus amyloliquefaciens
Bacillus siamensis
Bacillus velezensis
Bacillus velezensis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus tequilensis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus inaquosorum
Bacillus mojavensis
Bacillus mojavensis
Bacillus halotolerans
Bacillus halotolerans
Bacillus mojavensis
Bacillus halotolerans
Bacillus halotolerans
Bacillus halotolerans
Bacillus spizizenii
Bacillus spizizenii
Bacillus pumilus
Bacillus pumilus
Bacillus zhangzhouensis
Bacillus safensis
Bacillus safensis
Bacillus australimaris
Bacillus pumilus
Bacillus stratosphericus
Bacillus aerius
Bacillus altitudinis
Bacillus aerophilus
Bacillus stratosphericus
Bacillus xiamenensis
Bacillus atrophaeus
Bacillus atrophaeus
Bacillus nakamurai
Bacillus vallismortis
Bacillus vallismortis
Bacillus paralicheniformis
Bacillus haynesii
Bacillus sonorensis
Bacillus sonorensis
Bacillus piscis
B2
Bacillus licheniformis
Bacillus aerius
Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis
Bacillus licheniformis
Bacillus swezeyi
C
category
genus
Peribacillus muralis
Peribacillus muralis
B4
Peribacillus frigoritolerans
Peribacillus frigoritolerans
Peribacillus simplex
Peribacillus simplex
Peribacillus simplex
Peribacillus simplex
Peribacillus butanolivorans
Bacillus massiliogorillae
Peribacillus endoradicis
Bacillus massilioanorexius
Bacilo testis
Peribacillus loiseleuriae
Peribacillus gossypii
Peribacillus psychrosaccharolyticus
Peribacillus psychrosaccharolyticus
Peribacillus huizhouensis
Bacillus cihuensis
Peribacillus asahii
Peribacillus alkalitolerans
D
category
genus
Bacillus mycoides
Bacillus mycoides
Bacillus mycoides
Bacillus mycoides
Bacillus mycoides
Bacillus hominis
Bacillus mobilis
Bacillus marcorestinctum
Bacillus toyonensis
Bacillus wiedmannii
Bacillus fungorum
Bacillus pacificus
Bacillus thuringiensis
Bacillus sanguinis
Bacillus proteolyticus
Bacillus thuringiensis
B6
B9
B5
Bacillus thuringiensis
Bacillus paramobilis
Bacillus cereus
Bacillus cereus
Bacillus cereus
Bacillus cereus
Bacillus paranthracis
Bacillus cereus
Bacillus cereus
Bacillus paramycoides
Bacillus tropicumycoides
Bacillus anthracis
Bacillus anthracis
Bacillus anthracis
Bacillus nitratireducens
Bacillus albus
Bacillus tropicus
Bacillus luti
Bacillus gaemokensis
Bacillus bingmayongensis
Bacillus pseudomycoides
Bacillus pseudomycoides
Bacillus manliponensis
Bacillus cytotoxicus
Ectobacillus panaciterrae
Ectobacillus funiculus

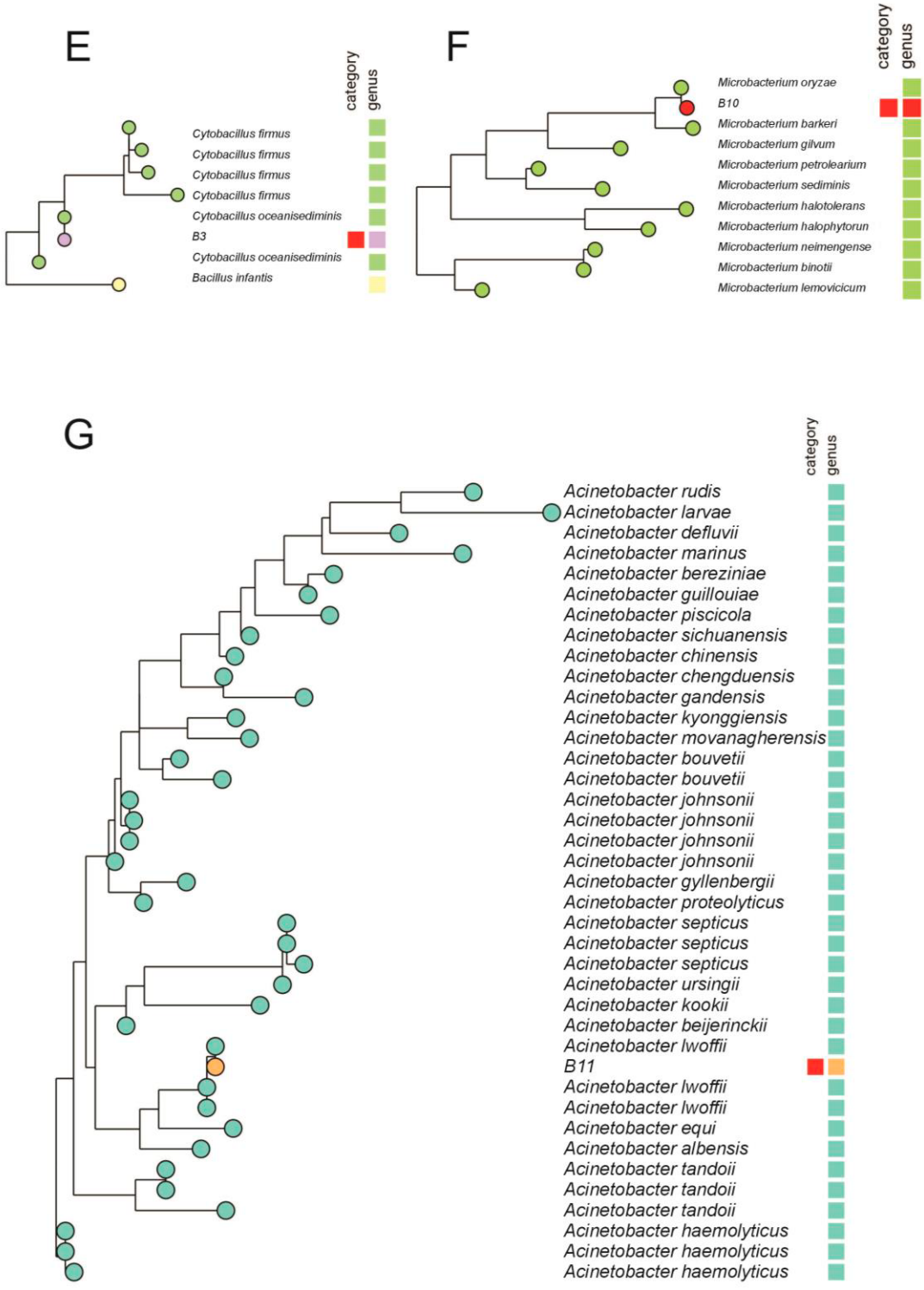


Figure 2. Maximum likelihood of phylogenetic reconstruction. A: P*aenibacillus* sp.; B: *Bacillus* sp.; C: *Cytobacillus* sp.; D: *Peribacillus* sp.; F: *Mycrobacterium* sp. B10; G: *Acitenobacter* sp.
Figura 2. Reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud. A: P*aenibacillus* sp.; B: *Bacillus* sp.; C: *Cytobacillus* sp.; D: *Peribacillus* sp.; F: *Mycrobacterium* sp. B10; G: *Acitenobacter* sp.

En relación al género de *Cytobacillus*, investigaciones realizadas por Tarasov *et al.* (2023) han reportado a *Cytobacillus pseudoceanisediminis*, *Cytobacillus oceanisediminis y Cytobacillus firmus* que resisten bien la acción de los compuestos tóxicos de metales pesados y pueden ser utilizadas en tecnologías de biorremediación. *Cytobacillus* sp. ha sido aislado de suelos contaminados con petróleo crudo, mostrando capacidad de remoción de metales como el niquel, cadmio y plomo (Hussein y Saeed 2022).

La capacidad de resistir a metales pesados en estos géneros se relaciona con la presencia de enzimas y genes de resistencia, que varían para cada microorganismo. La biotransformación bacteriana se considera esencial para una desintoxicación eficaz y para minimizar los riesgos tóxicos de los metales pesados en la seguridad ambiental, estas transformaciones incluyen la capacidad de *Bacillus cereus* MRS-1 para convertir Hg^{2+} en HgS, *Bacillus pumilus* S3 para transformar Pb^{2+} en PbS, *Bacillus* sp. KMO2 para convertir As^{3+} en As^{5+} y, *Microbacterium* sp. MRS-1 para la conversión de Co^{2+} a Co_3O_4 (Mathivanan *et al.*, 2021).

En consecuencia, la amenaza significativa originada por las actividades antropogénicas en el entorno ha impulsado la consideración de estrategias innovadoras de descontaminación. Es crucial explorar las interacciones entre las comunidades microbianas en ambientes contaminados (Chandran *et al.*, 2020). Por ende, es necesario profundizar en la investigación de estos géneros debido a sus posibles aplicaciones en los procesos de biorremediación. Además, se sugiere la utilización de diversos marcadores moleculares para una identificación precisa de los microorganismos, lo que permitirá comprender mejor las comunidades microbianas presentes en los suelo de minas abandonadas.

CONCLUSIONES

El aislamiento y la caracterización filogenética de bacterias nativas cultivables procedentes de minas abandonadas, permitió identificar nueve aislamientos que se agruparon filogenéticamente en seis géneros distintos *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Peribacillus* y *Acinetobacter*. La complejidad de las comunidades bacterianas en suelos de minas abandonadas resalta la importancia de comprender estas interacciones microbianas en entornos contaminados y profundizar en la investigación de estos géneros debido a sus posibles aplicaciones en los procesos de biorremediación.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el financiamiento de este estudio, y a la Dirección Regional de Energía y Minas de Tacna por la orientación como guía de campo en la etapa inicial del proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

Abdel-Razek, A. S., Refaat, B. M., Abdel-Shakour, E. H., Zaher, R. y Mohamed, M. K. 2015. Biodegradation of phenol by *Microbacterium terregenes* isolated from oil field NORM SOIL. Journal of Applied & Environmental Microbiology. 3(3):63-69. Disponible en: https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=abdea133f179c569675289bdbc82d9431ad28f51

Agarry, S. A., Owabor, C. N. y Yusuf, R. O. 2010. Bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbon oil mixtures: Evaluation of the use of animal manure and chemical fertilizer. Bioremediation Journal. 14(4):189-195. https://doi.org/10.1080/10889868.2010.514965

Agboola, O., Babatunde, D. E., Isaac Fayomi, O. S., Sadiku, E. R., Popoola, P., Moropeng, L., Yahaya, A. y Mamudu, O. A. 2020. A review on the impact of mining operation: Monitoring, assessment and management. Results in Engineering. 8:1-23. https://doi.org/10.1016/j.rineng.2020.100181

Ali, H. y Khan, E. 2017. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals'–proposal of a comprehensive definition. Toxicological and Environmental Chemistry. 1-26. https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652

Alotaibi, B. S., Khan, M. y Shamim, S. 2021. Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of *Bacillus* species. Microorganisms. 9(8):1-31. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081628

Altimira, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L. A. y Seeger, M. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. BMC Microbiology. 12(193):1-12. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193

Amrane, A., Nguyen, T. A., Mohan, D., Yasin, G. y Assadi, A. A. 2020. Nanomaterials for soil remediation. En: Micro & Nano Technologies Series. Amrane, D. Mohan, T. A. Nguyen, A. A. Assadi, y G. Yasin (eds.), pp 1-24. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822891-3.00021-9

AnalytikJena, Instructions for Use: innuPREP DNA/RNA Mini Kit. [Consultado 13 de febrero 2023] 2017. Disponible en: https://www.analytik-jena.fr/fileadmin/content/pdf_life_science/Manual/Manual_innuPREP_DNA_RNA_Mini_Kit.pdf

Aniszewski, E., Silva, R., Faria, F., Ferreira, S. G. y Soares, A. 2010. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmiun and zinc from hazardous industrial residue. Brazilian Journal of Microbiology. 41:235-245. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100033

Arce-Inga, M., González-Pérez, A. R., Hernandez-Diaz, E., Chuquibala-Checan, B., Chavez-Jalk, A., Llanos-Gomez, K. J., Leiva-Espinoza, S. T., Oliva-Cruz, S. M. y Cumpa-Velasquez, L. M. 2022. Bioremediation potential of cative *Bacillus* sp. strains as a sustainable strategy for cadmium accumulation of Theobroma cacao in amazonas region. Microorganisms. 10(11):1-19. https://doi.org/10.3390/microorganisms10112108

Ayangbenro, A. S. y Babalola, O. O. 2020. Genomic analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its heavy metal removal from polluted soil. Scientific Reports. 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-75170-x

Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B. V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B. S. y Tripathi, M. 2022. Recent strategies for

bioremediation of emerging pollutants: A review for a green and sustainable environment. Toxics. 10(8):1-24. https://doi.org/10.3390/toxics10080484

Bazzi, W., Abou, A. G., Nasser, A., Haraoui, L. P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V. K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., Knapp, C., McEvoy, M. M., Zaman, M. H., Higgins, P. G. y Matar, G. M. 2020. Heavy metal toxicity in armed conflicts potentiates AMR in *A. baumannii* by selecting for antibiotic and heavy metal co-resistance mechanisms. Frontiers in Microbiology. 11:1-12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068

Bini, C., Maleci, L. y Wahsha, M. 2017. Mine waste: Assessment of environmental contamination and restoration. En: Assessment, Restoration and Reclamation of Mining Influenced Soils, pp. 89-134. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809588-1.00004-9

Bôto, M., Magalhães, C., Perdigão, R., Alexandrino, D., Fernandes, J.., Bernabeu, A., Ramos, S., Carvalho, M., Semedo, M., LaRoche, J., Almeida, C. y Mucha, A. 2021. Harnessing the potential of native microbial communities for bioremediation of oil spills in the Iberian peninsula NW coast. Frontiers in Microbiology, 12(April). https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633659.

Cáceda, J., Maraza, G., Carpio, M., & Fora, G. 2022. Evaluation of the content of metals and contamination indices generated by environmental liabilities, in Tacna, Peru. Research Square, 1–16.

Cai, Y., Wang, R., Rao, P., Wu, B., Yan, L., Hu, L., Park, S., Ryu, M. y Zhou, X. 2021. Bioremediation of petroleum hydrocarbons using *Acinetobacter* sp. SCYY-5 isolated from contaminated oil sludge: Strategy and effectiveness study. International Journal of Environmental Research and Public Health. 18(2):1-14. https://doi.org/10.3390/ijerph18020819

Candeias, C., Ávila, P., Coelho, P. y Teixeira, J. P. 2019. Mining activities: Health impacts. En: Encyclopedia of Environmental Health. 2nd ed. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11056-5

Chandran, H., Meena, M. y Sharma, K. 2020. Microbial biodiversity y bioremediation assessment through omics approaches. *Frontiers in Environmental Chemistry*, *1*(September), 1-22. https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology y infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews. 17(4):840-862. https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Coelho, P. y Teixeira, J. P. 2011. Mining activities: Health impacts. In J. Nriagu (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health* (2nd ed., pp. 788-802). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11056-5

Çolak, F., Olgun, A., Atar, N. y Yazicioğlu, D. 2013. Heavy metal resistances and biosorptive behaviors of *Paenibacillus polymyxa*: Batch and column studies. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 19:863-869. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.11.001

Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Höfer, C., Puschenreiter, M., Widhalm, S., Swarnalakshmi, K. y Brader, G. 2020. Comparative genomics of *Microbacterium* species to teveal diversity, potential for secondary metabolites and heavy metal resistance. Frontiers in Microbiology. 11:1-17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01869

Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Kidd, P., Weyens, N. y Brader, G. 2015. Draft genome sequences of 10 *Microbacterium* spp., with emphasis on heavy metalcontaminated environments. Genome Announcements. 3(3):1-3. https://doi.org/10.1128/genomeA.00432-15

Dawwam, G. E., Abdelfattah, N. M., Abdel-Monem, M. O., Jahin, H. S., Omer, A. M., Abou-Taleb, K. A. y Mansor, E. S. 2023. An immobilized biosorbent from *Paenibacillus dendritiformis* dead cells and polyethersulfone for the sustainable bioremediation of lead from wastewater. Scientific Reports. 13(1):1-16. https://doi.org/10.1038/s41598-023-27796-w

Dhakephalkar, P. K. y Chopade, B. A. 1994. High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. BioMetals. 7(1):67-74. https://doi.org/10.1007/BF00205197

Dos Santos, H. R. M., Argolo, C. S., Argôlo-Filho, R. C. y Loguercio, L. L. 2019. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information, BMC Microbiology, 19(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/s12866-019-1446-2.

Fernandes, C. C., Kishi, L. T., Lopes, E. M., Omori, W. P., Souza, J. A. M. de, Alves, L. M. C. y Lemos, E. G. de M. 2018. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. Brazilian Journal of Microbiology. 49(3):1-14. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.006

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., y Yuan, Z. C. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. Microbial Cell Factories. 15(203):1-18. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7

Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J. y He, Y. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. Bioresource Technology. 101:8599-8605. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.085

Gupta, N., Balomajumder, C. y Agarwal, V. K. 2010. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation : A review. Journal of Hazardous Materials. 176:1-13. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038

Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T. y Richards, V. P. 2022. Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. Microbiome. 10(1):1-18. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y

Ho, M. T., Li, M. S. M., McDowell, T., MacDonald, J. y Yuan, Z. C. 2020. Characterization and genomic analysis of a diesel-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolated from Canadian soil. BMC Biotechnology. 20(39):1-15. https://doi.org/10.1186/s12896-020-00632-z

Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. 2018. Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02045

Huang, J., Huang, Z. L., Zhou, J. X., Li, C. Z., Yang, Z. H., Ruan, M., Li, H., Zhang, X., Wu, Z. J., Qin, X. L., Hu, J. H. y Zhou, K. 2019. Enhancement of heavy metals removal by microbial flocculant produced by *Paenibacillus polymyxa* combined with an insufficient hydroxide precipitation. Chemical Engineering Journal. 374:880-894. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.06.009

Hussein, M. H. y Saeed, I. O. 2022. Phytoremedation: Plant synergy - bacteria for treatment of heavy metals. Journal of

Pharmaceutical Negative Results. 13(1):933-941. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S01.111

Irawati, W., Parhusip, A. J. N., Sopiah, N. y Tnunay, J. A. 2016. The role of heavy metals-resistant bacteria *Acinetobacter* sp. in copper phytoremediation using *Eichhornia crasippes* [(Mart.) Solms]. Conference Proceedings: International Conference on Natural Resources and Life Sciences. 208-220. https://doi.org/10.18502/KLS.V3I5.995

Jan, U., Feiwen, R., Masood, J. y Chun, S. C. 2020. Characterization of soil microorganism from humus and indigenous microorganism amendments. Mycobiology. 48(5):392-398. https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1816154

Janda, J. M. y Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. 45(9):2761-2764. https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07

Jiang, H. H., Cai, L. M., Wen, H. H., Hu, G. C., Chen, L. G. y Luo, J. 2020. An integrated approach to quantifying ecological and human health risks from different sources of soil heavy metals. Science of the Total Environment. 1-41. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134466

Jiang, L., Jung, W. Y., Park, S. H., Kang, S. W., Lee, M. K., Lee, J. S., Lee, J. H. y Lee, J. 2021. Draft genome sequence of *Peribacillus* sp. AGMB 02131 isolated from feces of a Korean cow. Korean Journal of Microbiology. 57(1):66-68. https://doi.org/10.7845/kjm.2021.0119

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E. y Weinstock, G. M. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species y strain-level microbiome analysis. Nature Communications. 10(1):1-11. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1

Jung, J., Jeong, H., Kim, H. J., Lee, D. W. y Lee, S. J. 2016. Complete genome sequence of *Bacillus oceanisediminis* 2691, a reservoir of heavy-metal resistance genes. Marine Genomics. 30:1-4. https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.07.002

Jung, J. y Park, W. 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 99(6):2533-2548. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y

Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K. y Benckiser, G. 2015. Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. Brazilian Journal of Microbiology. 46(3):659-666. https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130516

Kapahi, M. y Sachdeva, S. 2019. Bioremediation options for heavy metal pollution. Journal of Health and Pollution. 9(24):1-20. https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203

Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A. y Mahmudy Gharaie, M. H. 2015. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. International Biodeterioration and Biodegradation. 99:123-128. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009

Kim, H. S., Srinivasan, S. y Lee, S. S. 2015. *Paenibacillus alba nov.*, Isolated from peat soil. Current Microbiology. 70(6):865-870. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0795-9

Kumar, B. y Gopal, D. 2015. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. 3 Biotech. 5:1-10. https://doi.org/10.1007/s13205-015-0293-6

Learman, D. R., Ahmad, Z., Brookshier, A., Henson, M. W., Hewitt, V., Lis, A., Morrison, C., Robinson, A., Todaro, E., Wologo, E., Wynne, S., Alm, E. W. y Kourtev, P. S. 2019. Comparative genomics of 16 *Microbacterium* spp. that tolerate multiple heavy metals and antibiotics. PeerJ. 1-19. https://doi.org/10.7717/peerj.6258

Liu, P., Zhang, Y., Tang, Q. y Shi, S. 2021. Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability. Biochemical Engineering Journal. 166:1-27. https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107856

Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N. y Cherif, A. 2013. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites In Tunisia: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. New Biotechnology. 30(6):723-733. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.004

Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X. y Meng, D. 2021. Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, *226*, 112863. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112863

Mekuto, L., Alegbeleye, O. O., Ntwampe, S. K. O., Ngongang, M. M., Mudumbi, J. B. y Akinpelu, E. A. 2016. Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. 3 Biotech. 6(173):1-11. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0491-x

Méndez, V., Fuentes, S., Morgante, V., Hernández, M., González, M., Moore, E. y Seeger, M. 2017. Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 17(4):1074-1087. https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400017

Morrissey, E. M., Mau, R. L., Schwartz, E., Caporaso, J. G., Dljkstra, P., Van Gestel, N., Koch, B. J., Liu, C. M., Hayer, M., McHugh, T. A., Marks, J. C., Price, L. B. y Hungate, B. A. 2016. Phylogenetic organization of bacterial activity. The ISME Journal. 10(9):2336-2340. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.28

Nagvenkar, G. S. y Ramaiah, N. 2010. Arsenite tolerance and biotransformation potential in estuarine bacteria. *Ecotoxicology*, *19*(4), 604-613. https://doi.org/10.1007/S10646-009-0429-8/METRICS

Nutman, A., Lerner, A., Schwartz, D. y Carmeli, Y. 2016. Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii.* Clinical Microbiology and Infection. 1-12. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.08.020

Ortega Sánchez, M. E., Morales, M. C., Morales, J. A., Osorio, G. P., Carlos, J. y Hernández, M. 2018. Bioedegradation of hydrocarbons by bacteria producing biosurfactants. *Revista Latinoamericana El Ambiente y Las Ciencias*, *9*(21), 1643-1656. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

Onuoha, S. C. 2014. Stimulated biodegradation of spent lubricating motor oil in soil Amended with Animal Droppings. American Journal of BioScience. *2*(1):19. https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20140201.14

Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Bhatt, P. y Samant, M. 2022. Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem. Frontiers in Microbiology, 13. https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.824084

Patel, S. y Gupta, R. S. 2020. A phylogenomic and comparative

genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of bacillus species, *Peribacillus gen. nov.*, *Cytobacillus gen. nov.*, *Mesobacillus gen. nov.*, *Neobacillus gen. nov.*, *Metabacillu*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70(1):406-438. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775

Pereira, P. P., Torres Tejerizo, G. A., Fernandez, M., Blanch, A. R., Gonzalez, P. S. y Agostini, E. 2020. Polyphasic characterization and identification of the bioremediation agent *Bacillus* sp. SFC 500-1E. Genomics. 112:4525-4535. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.008

Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K. y Suar, M. 2019. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. Microbial Diversity in the Genomic Era. 137-152. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5

Ran, X., Zhu, Z., Long, H., Tian, Q., You, L., Wu, X., Liu, Q., Huang, S., Li, S., Niu, X., & Wang, J. (2021). Manganese Stress Adaptation Mechanisms of *Bacillus safensis* Strain ST7 From Mine Soil. Frontiers in Microbiology, 12 (November). https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758889

Rawat, M. y Rai, J. P. N. 2012. Adsorption of heavy metals by *Paenibacillus validus* strain MP5 isolated from industrial effluent-polluted soil. Bioremediation Journal. 16(2):66-73. https://doi.org/10.1080/10889868.2012.665959

Restrepo, O., Montoya, C. y Muñoz, N. 2006. Microbial degradation of cyanide from gold metallurgical plants utilizing *P. fluorecens*. Dyna. 73(149):45-51. https://www.researchgate.net/publication/262467370

Rzymski, P., Klimaszyk, P., Marszelewski, W., Borowiak, D., Mleczek, M., Nowiński, K., Pius, B., Niedzielski, P. y Poniedziałek, B. 2017. The chemistry and toxicity of discharge waters from copper mine tailing impoundment in the valley of the Apuseni Mountains in Romania. Environmental Science and Pollution Research, 24(26), pp. 21445-21458. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9782-y

Salam, L. B., Obayori, O. S. y Olatoye, N. O. 2014. Biodegradation of anthracene by a novel *Actinomycetes*, *Microbacterium* sp. isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 30(1):335-341. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1437-7

Salam, M. y Varma, A. 2019. Bacterial community structure in soils contaminated with electronic waste pollutants from Delhi NCR, India. Electronic Journal of Biotechnology. 41:72-80. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.07.003

Sermet, E. y Nieć, M. 2021. Not mining sterilization of explored mineral resources. The example of native sulfur deposits in poland case history. Resources, 10(4), pp. 1-12. https://doi.org/10.3390/resources10040030

Sernaque Aguilar, Y. A., Cornejo La Torre, M., Regard, J. P. y Mialhe Matonnier, E. L. 2019. Caracterización molecular de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de pozas de lixiviación con cianuro. Revista Peruana de Biología. 26(2):275-282. https://doi.org/10.15381/rpb.v26i2.16383

Sevak, P., Pushkar, B. y Mazumdar, S. 2023. Mechanistic evaluation of chromium bioremediation in Acinetobacter junii strain b2w: A proteomic approach. *Journal of Environmental Management*, *328*, 116978. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116978

Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y. y Qian, M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. Environmental Pollution. 156:1164-1170. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.04.007

Shibulal, B., Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S. y Joshi, S. J. 2017. The potential of indigenous *Paenibacillus ehimensis* BS1 for recovering heavy crude oil by biotransformation to light fractions. PLoS ONE. 12(2):1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171432

Starostin, K. V., Demidov, E. A., Bryanskaya, A. V., Efimov, V. M., Rozanov, A. S. y Peltek, S. E. 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. Scientific Reports. 5:1-9. https://doi.org/10.1038/srep16989

Tabak, M., Lisowska, A., Filipek-Mazur, B., & Antonkiewicz, J. 2020. The effect of amending soil with waste elemental sulfur on the availability of selected macroelements and heavy metals. Processes, *8*(10), 1–13. https://doi.org/10.3390/pr8101245

Tarasov, K., Yakhnenko, A., Zarubin, M., Gangapshev, A., Potekhina, N. V., Avtukh, A. N. y Kravchenko, E. 2023. *Cytobacillus pseudoceanisediminis* sp. *nov*., A Novel Facultative Methylotrophic Bacterium with High Heavy Metal Resistance Isolated from the Deep Underground Saline Spring. Current Microbiology. 80(31):1-10. https://doi.org/10.1007/s00284-022-03141-8

Vaishnavi, S., Thamaraiselvi, C. y Vasanthy, M. 2019. Efficiency of Indigenous Microorganisms in Bioremediation of Tannery Effluent. Waste Water Recycling and Management. 151-168. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2619-6_13

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E. y Vargas-Albores, F. 2015. El Gen ARNr 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. Ciencias Marinas. 41(4):297-313. https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492

Verma, S. y Kuila, A. 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. Environmental Technology and Innovation. 14(100369):1-11. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews. 51(2):221-271. https://doi.org/10.1139/m88-093

Wuana, R. A. y Okieimen, F. E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. International Scholarly Research Network. 201:1-20. https://doi.org/10.5402/2011/402647

Wufuer, R., Li, W., Wang, S. y Duo, J. 2022. Isolation and Degradation Characteristics of PBAT Film Degrading Bacteria. International Journal of Environmental Research and Public Health. 19(17087):1-12. https://doi.org/10.3390/ijerph192417087

Zahoor, A. y Rehman, A. 2009. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. Journal of Environmental Sciences. 21(6):814-820. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62346-3

Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H. y Jiang, L. 2020. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. Chemical Engineering Journal. 398:1-19. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125657

Zhou, Z., Charlesworth, J. y Achtman, M. 2020. Accurate reconstruction of bacterial pan- and core genomes with PEPPAN. Genome Research. 30(11):1667-1679. https://doi.org/10.1101/gr.260828.120

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Efectividad de cepas de *Trichoderma* spp., y *Lecanicillium* spp., en el control de la roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) en el cultivo del café en Nayarit, México

Effectiveness of *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium* spp. strains in the control rust (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) in coffee cultivation in Nayarit, Mexico

Roberto Sánchez-Lucio[1], Ernesto González-Gaona[2], J. Saúl Padilla-Ramírez[2], Miguel Ángel Gallegos-Robles[1]*, Uriel González-Salas[1], Rafael Gómez-Jaimes[3] y Karla Vanessa De Lira-Ramos[2]

[1] Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango CP 35111.
[2] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. C.E. Pabellón, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes CP 20660.
[3] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. C.E. Santiago, Santiago Ix-cuintla, Nayarit, CP 63300.

ABSTRACT

The main coffee disease worldwide is rust by *Hemileia vastatrix*, which causes losses of up to 40% in production. Biological control with antagonistic fungi represents a management option compatible with the environment. *Trichoderma* and *Lecanicillium* strains native to the coffee producing areas of Nayarit were isolated and evaluated under field conditions. In general, *Lecanicillium* strains showed better performance than *Trichoderma* strains, with the exception of strain 39, in protecting coffee leaves against *Hemileia vastatrix* rust, with 80 % effectiveness and reductions in the damage scale at 1 and 2. Therefore, these strains represent a good option for the biological control of *Hemileia vastatrix* in the study area. Besides, if combat measures are not applied, the infestation percentages reach 85 % and the damage levels are 3 and 4, causing severe coffee cultivation production losses.

Keywords: Biological control; Incidence; Severity; *Trichoderma*; *Lecanicillium*

RESUMEN

La principal enfermedad del café a nivel mundial es la roya causada por *Hemileia vastatrix*, que ocasiona pérdidas hasta del 40 % en la producción. El control biológico con hongos antagonistas representa una opción de manejo compatible con el ambiente. Se aislaron y evaluaron en condiciones de campo cepas de *Trichoderma* y *Lecanicillium* nativas de la zona cafetalera de Nayarit. En general las cepas de *Lecanicillium* presentaron mejor desempeño que las de *Trichoderma* con excepción de la cepa 39 en la protección de las hojas de café contra la roya con efectividades del 80 % y reducciones en la escala de daño a 1 y 2. Por lo anterior, estas cepas representan una buena opción en el control biológico de *Hemileia vastatrix*, en el área de estudio. Por otra parte, si no se aplican medidas de combate los porcentajes de infestación llegan al 85 % y los niveles de daño son del 3 y 4, provocando graves pérdidas en la producción del cultivo del café.

Palabras clave: Control biológico; Incidencia; Severidad; *Trichoderma*; *Lecanicillium*

INTRODUCCIÓN

En México, el café orgánico (arábica) es altamente demandado y genera hasta 500 mil empleos en 15 entidades federativas con una superficie estimada de 761 mil hectáreas (Torres-Castillo *et al*., 2020). Los principales estados productores son Chiapas, Veracruz y Oaxaca con una superficie de 253,458; 145,211 y 134,113 ha respectivamente. Otros estados productores importantes son: Puebla, Guerrero, Hidalgo, Nayarit y San Luis Potosí (SIAP, 2020). Según la Organización Internacional del Café (OIC), Brasil, Colombia y Vietnam encabezan la lista como los principales productores a nivel mundial, mientras que México es el onceavo productor mundial (SAGARPA, 2018). El café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional, y una mínima reducción en el rendimiento o un ligero aumento en los costos de producción de este cultivo por efecto de *H. vastatrix*, puede tener un gran impacto en los cafeticultores y en los países cuyas economías son totalmente dependientes de las exportaciones del café (Arneson, 2000; Talhinhas *et al*., 2017).

Actualmente, México es el principal productor de café orgánico del mundo. Sin embargo, ha tenido una lenta recuperación debido a las grandes pérdidas de producción desde 2012 y 2013, años de la "crisis de la roya" ocasionadas por brotes tempranos y altamente agresivos tanto de la broca como de la roya del café (Avelino *et al*., 2015; Torres-Castillo *et al*., 2020).

La roya del café *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome (Basidiomycota: Pucciniales), fue descrita en 1869 en África oriental y Ceilán. Desde entonces se ha extendido a las áreas de cultivo de café en todo el mundo. Esta enfermedad ha producido los mayores brotes en Asia, África y América, ocasionando grandes pérdidas de rendimiento, lo que la convierte en la más importante enfermedad del café arábiga en huertos comerciales de muchos países tropicales y subtropicales (Talhinhas *et al*., 2017). En México la roya del

*Autor para correspondencia: Miguel Angel Gallegos Robles
correo-e: garoma64@hotmail.com
Recibido: 24 de mayo de 2023
Aceptado: 29 de enero de 2024
Publicado: 07 de febrero de 2024

café se ha reportado en: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, San Luis Potosí, Jalisco, Colima, Tabasco, Estado de México, Querétaro, Morelos y Michoacán (SENASICA, 2016).

Su ataque provoca la caída prematura de hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles atacados, una maduración irregular y reducción de la producción en el siguiente ciclo del 20 %; en infecciones severas puede ocasionar la muerte regresiva de ramas e incluso la muerte de árboles (Chain-Guadarrama *et al*., 2019; Pilozo *et al*., 2022).

Para el control de la roya del café la mayoría de los productores realizan la aplicación de fungicidas de síntesis química; sin embargo, esto trae incrementos en los costos de producción, deterioro de los agroecosistemas y baja sustentabilidad a mediano y largo plazo (Arneson, 2000; Johnson *et al*., 2020; Torres-Castillo *et al*., 2020). Por otra parte, mediante la producción orgánica es posible producir alimentos de alta calidad, además de conservar y mejorar los recursos naturales. También contribuye al cuidado de la salud de los trabajadores agrícolas y consumidores (Cervantes y Estrada, 2018).

Actualmente, una de las estrategias más sustentables para manejo de la roya del café, es el control biológico con el uso de microorganismos. La utilización de cepas antagónicas del hongo *Trichoderma* spp., para el control de la roya del café han disminuido la incidencia y severidad de la enfermedad a niveles que no afectan el rendimiento y la calidad de la cereza (Talhinhas *et al*., 2017; Johnson *et al*., 2020), ya que las especies de *Trichoderma* son antagonistas sobre patógenos perjudiciales, además de su efecto como hiperparásito que suprime a los microorganismos que generan las enfermedades fitopatógenas (Cubilla *et al*., 2019).

Lecanicillium lecanii es considerado un hongo hiperparásito de *H. vastatrix* en forma natural (Gómez *et al*., 2018). Asimismo, González y Surís (2007), reportaron un estudio donde obtuvieron como resultado un alto porcentaje de parasitismo y deformación de las uredosporas del fitopatógeno, por lo que resultó exitoso como herramienta para reducir la incidencia y severidad de *H. vastatrix*. También Vandermeer *et al*. (2009), reportaron la evidencia de hiperparasitismo a *H. vastatrix* por el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, a través de un mecanismo ecológico complejo.

El objetivo de este estudio fue seleccionar cepas de los hongos *Trichoderma* spp., y *Lecanicillium* spp., presentes en suelo y follaje de huertos de café de las zonas cafetaleras de Nayarit, y evaluar su efectividad biológica en condiciones de campo contra la roya causada por *H. vastatrix*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se estableció en la localidad "La casa" en el ejido de Cumbres de Huicicila, en el Municipio de Compostela, Nayarit (21° 01´ 48´´ latitud N y 105° 0´45´´ longitud W y 860 msnm). La huerta se considera como un sistema productivo rústico tradicional o de montaña (Moguel y Toledo, 1999), con tendencia a orgánico, de temporal, café tipo arábiga, de tres años con Catimor (Caturra X Hibrido Timor) y Típica, con cosecha durante los meses de diciembre a febrero, con reporte de alta incidencia de la roya del café en ciclos anteriores, la vegetación empleada como sombra abarca guamo (*Inga* spp.), cuero de indio (*Bursera simaruba* (L.) Sarg. 1890) tepehuacate (*Lysiloma acapulcense* (Kunth) Benth.), tepezapote (*Ternstroemia tepezapote* Schltdl. & Cham.) y forma parte de la provincia fisiográfica de la Faja Volcánica Transmexicana, con clima cálido subhúmedo con vegetación considerada como selva baja caducifolia y selva perennifolia (INEGI, 2010).

Recolecta de muestras para aislamiento de *Trichoderma* y *Lecanicillium*

Las cepas empleadas en el estudio se aislaron del suelo y follaje de huertos de café de las zonas cafetaleras de Nayarit en los municipios de Tepic, Xalisco, San Blas, Rosamorada, Compostela, Ruíz y Santiago Ixcuintla. Se realizaron recolectas en octubre y noviembre del 2021 de un total de 15 huertos que no han sido perturbados por actividades agrícolas y con abundante vegetación. Las muestras obtenidas fueron de suelo y follaje de cafetos, raíces de gramíneas, raíces adventicias y hojas de árboles silvestres. En el caso de las muestras de suelo, éstas se tomaron debajo de la copa de tres árboles por huerto, así mismo se quitó la hojarasca superficial y se obtuvo 1.0 kg de muestra compuesta de los primeros 30 cm de profundidad de suelo, mientras que del follaje de los mismos árboles se consideraron 10 hojas por planta. En el caso de las raíces adventicias se cortaron pedazos de raíz de seis árboles por huerto diferentes a los seleccionados para muestras de suelo. Posteriormente las muestras se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Santiago Ixcuintla, del INIFAP-Nayarit para su almacenamiento y procesamiento.

Aislamiento y selección de cepas

Las cepas de *Trichoderma* y *Lecanicillium* se aislaron a partir de muestras de suelo mediante la técnica de diluciones seriadas (proporción de 1.0 gramo de suelo por 9.0 mL de agua estéril, respectivamente). Estas muestras se sembraron en cajas Petri de 9.0 cm de diámetro, utilizando medio de cultivo PDA. Posteriormente, se realizaron resiembras sucesivas hasta obtener cultivos puros, de los cuales se obtuvieron cepas monospóricas, siguiendo la metodología descrita por Gilchrist-Saavedra *et al*. (2005). En el caso del follaje y las raíces adventicias, se realizaron raspados del tejido vegetal donde se observaba crecimiento micelial, y se sembraron por estriado en el medio utilizando un asa bacteriológica. Posteriormente, se llevó a cabo la identificación morfológica de las cepas de *Trichoderma* spp., siguiendo la guía taxonómica de Siddiquee (2017), donde se consideraron características macroscópicas como la forma y disposición de conidios y conidióforos, fiálides y clamidosporas, así como la textura del micelio, la formación de anillos concéntricos y la pigmentación de los conidios. En cuanto a las cepas de *Lecanicillium* spp., su identificación se basó en claves taxonómicas tanto generales como específicas (Humber, 1997; Zare y Gams, 2004).

De las cepas aisladas, tanto del suelo como de follaje y raíces adventicias, se determinó su capacidad de crecimiento radial y velocidad de esporulación. Se seleccionaron aquellas que mostraron el crecimiento más rápido y una mayor rapidez en la esporulación. Se obtuvieron 12 cepas de *Trichoderma* (1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 28, 31, 39) y tres de *Lecanicillium* (1, 3 y 4) (Tabla 1). Para su evaluación en campo las cepas se incrementaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Se realizó un conteo del número de esporas mediante un hematócimetro para obtener una concentración de 1.0 x 10^8 esporas por mL. Los tratamientos (cepas) se aplicaron con mochila Swissmex de 15 L, con boquilla de cono para insecticidas. A todos los tratamientos se les adicionó adherente Inex® a dosis de 1.0 ml/L de agua más 10 mL de Tween 20® para provocar la emulsión, en total se realizaron cinco aplicaciones con intervalo cada siete días.

Pruebas en fase de campo para el control de roya

Se realizaron de septiembre de 2021 a enero de 2022, en un diseño en bloques completos al azar con 16 tratamientos (15 cepas más un testigo absoluto) y 20 repeticiones por tratamiento, considerando un árbol como unidad experimental. En cada unidad experimental se marcó la hoja central de la rama donde se determinó la incidencia en la rama y la severidad de la enfermedad en dicha hoja.

Para la incidencia se contaron las hojas presentes en la rama seleccionada y las hojas con daño y se determinó el porcentaje de hojas dañadas (SENASA, 2013; Julca *et al*., 2019). Mientras que para la severidad se recolectó la hoja marcada y se determinó el grado de daño acorde a la escala de Eske, 1983 (Figura 1); la cual considera los siguientes niveles: 0 = sano, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = alta y 4 = muy alta. Donde el nivel l, es cuando existen pústulas en 1 - 5 % de la superficie de la hoja, nivel 2 se presentan pústulas en 6 - 20 % de la superficie de la hoja, nivel 3 se observan pústulas en el 21 - 50 % de la superfcicie de la hoja y el nivel 4 cuando hay > 50 % de la superficie de la hoja afectada. Los datos obtenidos se transformaron a media ponderada de la infección (Townsend y Heuberger, 1943) mediante la siguiente formula:

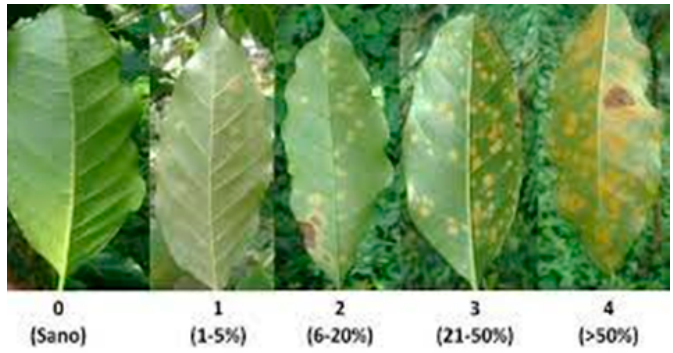


Figura 1. Escala para determinar la severidad del daño por roya en hojas de café.
Figure 1. Scale to determine the severity of rust damage in coffee leaves.

$$PI = [\Sigma(n*v)/CM*N]*100$$

Donde: PI= media ponderada de infección, n = número de hojas por cada clase en la escala, v = valor numérico de cada clase, CM= categoría mayor, N = número total de hojas en la muestra. Para su análisis, los datos se transformaron a raíz cuadrada de X+0.5 para disminuir la varianza y se analizaron mediante el paquete estadístico SAS ver 9.2 (SAS, 2010) y las diferencias entre medias se compararon mediante Tukey al 0.05 %. Para determinar la efectividad biológica de los tratamientos, se aplicó la fórmula de Abbott (1987):

Table 1. Collection sites of coffee rust antagonists in Nayarit.
Tabla 1. Sitios de recolecta de antagonistas de la roya del café en Nayarit.

Localidad	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud	Antagonista/Cepa	Origen*
El Sombrero	Ruiz	22°04´52´´	104°52´07´´	930	*Trichoderma spp.* 13	R. adv.
Banco Colorado	Ruiz	22°04´50´´	104°52´19´´	840	*Trichoderma spp.* 27	R. adv.
El Guajolote	Ruiz	22°04´51´´	104°52´33´´	810	*Trichoderma spp.* 4	R. adv.
Las Carboneras	Compostela	21°01´48´´	105°00´45´´	860	*Trichoderma spp.* 11	R. adv.
La Barranca	Compostela	21°19´33´´	105°01´45´´	920	*Lecanicillium spp.* 3	Follaje
La Mataiza	Compostela	21°17´38´´	105°00´24´´	930	*Trichoderma spp.* 1	R. adv.
Los Planteles	Compostela	21°18´47´´	105°00´45´´	870	*Trichoderma spp.* 15	R. adv.
El Guayabo	Compostela	21°17´43´´	105°02´12´´	940	*Lecanicillium spp.* 1	Follaje
Analco	Santiago Ixcuintla	21°52´05´´	104°58´02´´	475	*Trichoderma spp.* 25	Raíz
Las Iguanas	Santiago Ixcuintla	21°52´08´´	104°57´59´´	468	*Trichoderma spp.* 28	Raíz
Las Víboras	Santiago Ixcuintla	21°52´03´´	104°57´46´´	491	*Trichoderma spp.* 39	Suelo
Los Cerritos	Santiago Ixcuintla	21°52´42´´	104°57´28´´	483	*Trichoderma spp.* 6	Raíz
El Terruño	Santiago Ixcuintla	21°52´06´´	104°57´38´´	466	*Trichoderma spp.* 9	Suelo
La Guamera	Xalisco	21°23´43´´	105°00´34´´	1020	*Lecanicillium spp.* 4	Follaje
Malinal Viejo	Xalisco	21°22´56´	105°00´22´´	1020	*Trichoderma spp.* 31	Suelo

***** origen del aislamiento: suelo, follaje, raíz adventicia

Tabla 2. Incidencia de la roya del café bajo tratamientos de control biológico con cepas de *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* en Compostela, Nayarit.
Table 2. Incidence of coffee rust under biological control treatments with *Trichoderma spp.* and *Lecanicillium spp.* strains in Compostela, Nayarit.

Tratamiento (Cepa)	Incidencia (%)
Testigo sin tratamiento	4.8* a
Trichoderma spp. 13	3.4 b
Trichoderma spp. 11	2.4 bc
Trichoderma spp. 06	2.2 bc
Trichoderma spp. 01	2.1 bc
Trichoderma spp. 09	2.05 bc
Trichoderma spp. 15	2.04 bcd
Trichoderma spp. 04	2.0 bcd
Trichoderma spp. 31	1.8 bcd
Trichoderma spp. 25	1.75 bcd
Trichoderma spp. 28	1.7 bcd
Trichoderma spp. 27	1.6 bcd
Lecanicillium spp. 04	1.53 cd
Lecanicillium spp. 03	1.0 cd
Trichoderma spp. 39	0.99 d
Lecanicillium spp. 01	0.92 d

$$\%E= [IT-It/IT]*100$$

Donde: % E = porcentaje de efectividad, IT = infección en el testigo, It = infección en el tratamiento.

Antes de la aplicación de los tratamientos, donde se detectó una infestación inicial de la enfermedad se realizó un blanqueo, el cual consistió eliminar todas las hojas dañadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia

Todos los tratamientos de control biológico fueron estadísticamente diferentes con respecto al testigo, siendo este último el que mostró la mayor incidencia de roya (Tabla 2). En términos generales, los tratamientos basados en *Lecanicillium* exhibieron una menor incidencia de roya en comparación con los tratamientos de *Trichoderma*, con la excepción de la cepa 39. La cepa de *Trichoderma* con un rendimiento inferior fue la cepa 13, aunque no difirió significativamente de la mayoría de las cepas de *Trichoderma* evaluadas. En cuanto a esta variable, se observó la menor incidencia de roya en los tratamientos con *Trichoderma* 39 y *Lecanicillium* 1. El grado de parasitismo generado por estos dos organismos contra *H. vastatrix* también fue reportado por Halpay *et al*. (2020) en condiciones de laboratorio.

Severidad y porcentaje de infestación

En relación con la severidad de la roya en las hojas bajo tratamiento de control biológico (Tablas 3 y 4), se observó que todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo. Las cepas que exhibieron un menor grado de severidad de daño fueron *Trichoderma* 39 (valor de 1.04), *Lecanicillium* 1 (valor de 1.24), *Lecanicillium* 3 (valor de 1.25)

Tabla 3. Severidad de la roya del café, porcentaje de infestación (PI) y efectividad biológica (EB) bajo tratamiento de control biológico con cepas de *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* en Compostela, Nayarit.
Table 3. Coffee rust severity, infestation percentage (PI) and biological effectiveness (EB) under biological control treatment with *Trichoderma spp.* and *Lecanicillium spp.* strains in Compostela, Nayarit.

Tratamiento	Severidad	PI	EB
Testigo sin tratamiento	3.31 a	85	
Trichoderma spp. 11	1,92 b	28.75	66.17
Trichoderma spp. 13	1.85 bc	36.25	57.35
Trichoderma spp. 09	1.71 bc	25.0	70.58
Trichoderma spp. 06	1.68 bc	26.25	69.11
Trichoderma spp. 15	1.65 bc	25.0	70.58
Trichoderma spp. 28	1.62 bcd	20.0	76.47
Trichoderma spp. 04	1.60 bcde	23.75	72.05
Trichoderma spp. 25	1.56 bcde	21.25	75.0
Trichoderma spp. 27	1.50 bcde	17.5	79.41
Trichoderma spp. 01	1.49 bcde	25.0	70.58
Trichoderma spp. 31	1.32 cde	22.5	73.52
Lecanicillium spp. 04	1.29 cde	15.0	82.35
Lecanicillium spp. 03	1.25 de	15.0	82.35
Lecanicillium spp. 01	1.24 de	10.0	88.23
Trichoderma spp. 39	1.04 e	13.75	83.82

*Niveles en la escala de incidencia 1 = leve, 2 = moderada, 3 = alta y 4 = muy alta.

Tabla 4. Nivel de daño por la roya del café bajo tratamiento de control biológico con cepas de *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* en Compostela, Nayarit**.**
Table 4. Coffee rust damage level under biological control treatment with *Trichoderma spp.* and *Lecanicillium spp.* strains in Compostela, Nayarit.

Tratamiento	Nivel de daño*				
	0	1	2	3	4
Testigo sin tratamiento	0	0	0	12	8
Trichoderma spp. 11	2	13	5	0	0
Trichoderma spp. 13	0	11	9	0	0
Trichoderma spp. 09	3	14	3	0	0
Trichoderma spp. 06	3	13	4	0	0
Trichoderma spp. 15	4	12	4	0	0
Trichoderma spp. 28	4	16	0	0	0
Trichoderma spp. 04	5	11	4	0	0
Trichoderma spp. 25	5	13	2	0	0
Trichoderma spp. 27	5	14	1	0	0
Trichoderma spp. 01	2	16	2	0	0
Trichoderma spp. 31	6	10	4	0	0
Lecanicillium spp. 04	8	12	0	0	0
Lecanicillium spp. 03	9	10	1	0	0
Lecanicillium spp. 01	12	8	0	0	0
Trichoderma spp. 39	9	11	0	0	0

*Escala de Eske, 1983 para evaluación de daño por roya del cafeto. Niveles en la escala de incidencia 0 = sano 1 = leve, 2 = moderada, 3 = alta y 4 = muy alta.

y *Lecanicillium* 4 (valor de 1.29). Estos niveles de severidad encontrados en la presente investigación son comparables a los reportados por Alomía-Lucero y Cosigna-Eslava (2021), quienes registraron valores de severidad de daño de 0.93 con el uso de *Lecanicillium* y 1.27 con *Trichoderma*. Por otro lado, las cepas de *Trichoderma* 11 y 13 mostraron un rendimiento inferior, aunque no difirieron estadísticamente de las cepas 9, 6, 15, 28, 4, 25, 27 y 1. Las cepas de mejor desempeño fueron *Trichoderma* 39 y 31, así como *Lecanicillium* 1, 3 y 4.

Los valores de infestación (PI) variaron del 10 al 36.25 % en los tratamientos con control biológico, mientras que en el testigo fue del 85 %, los de menor PI fueron los tratamientos con *Lecanicillium* y *Trichoderma* 39 con PI del 10 - 15 %, estos resultados son inferiores a los obtenidos por Alomía-Lucero y Cosigna-Eslava (2021), quienes reportaron valores de 35 a 36.47 % de infestación utilizando la combinación de *Trichoderma* y *Lecanicillium*. En general los tratamientos con control biológico presentaron un 70 % de efectividad con excepción de la cepa 13 de *Trichoderma*. Los mejores tratamientos fueron las tres cepas de *Lecanicillium* y la cepa *Trichoderma* 39 con 80 % de efectividad. Gómez-De la Cruz *et al*. (2017) reportan que *Lecanicillium* spp., presentó un nivel de control de 68.10 %, a las 120 horas posteriores a la inoculación con roya del café. Estos datos son inferiores a los encontrados en esta investigación. Arriola *et al*. (1998) mencionaron que el porcentaje de parasitismo de *Lecanicillium* sp., varía entre especies y aislamientos.

Al aplicar los tratamientos de control biológico con *Trichoderma* y *Lecanicillium*, los niveles de daño en las hojas (ver Tabla 4) se sitúan predominantemente en las categorías 1 y 2, mientras que en ausencia de control, los niveles de daño alcanzan las categorías 3 y 4, como se observa en el testigo. Este fenómeno se atribuye a la capacidad del *Trichoderma* como hongo micoparásito, el cual ataca, penetra y elimina al hongo *H. vastatrix* (Vidal-Martínez *et al*., 2021). León *et al*. (2019) corroboraron que *Trichoderma* genera un 100% de micoparasitismo, gracias a los metabolitos que inhiben el crecimiento micelial de *H. vastatrix*, promoviendo así la obtención de niveles bajos de daño. De manera similar, Díaz-Vicente *et al*. (2014) señalan que *Lecanicillium lecanii* ha sido identificado como micoparásito de *H. vastatrix*.

El nivel de parasitismo inducido por los dos organismos (*Trichoderma* y *Lecanicillium*) sobre *H. vastatrix* fue también documentado por Halpay *et al*. (2020) en condiciones de laboratorio. Los grados de severidad identificados en este trabajo de investigación son consistentes con los informados por Alomía-Lucero y Cosigna-Eslava (2021), quienes señalan valores de severidad de daño de 0.93 y 1.27 para *Lecanicillium* y *Trichoderma*, respectivamente.

El hongo antagonista *Trichoderma* spp., se ha utilizado como agente de control biológico para combatir enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos. Este hongo afecta el desarrollo de los fitopatógenos al competir por recursos, producir antibiosis, alimentarse de ellos mediante enzimas líticas y micoparasitismo (Fravel, 1988; Ghrisalberti y Sivacithamparam, 1991; López-Ferrer *et al*., 2017). Además, se ha reportado que *Trichoderma* induce mecanismos de resistencia al producir fitoalexinas, flavonoides y derivados fenólicos (Vinale *et al*., 2010; Mukerjhee *et al*., 2013) y promueve el crecimiento vegetal mediante la producción de sideróforos que facilitan la absorción de nutrientes y fitohormonas (Castro y Revillas, 2005; Ortuño *et al*., 2013; Candelero *et al*., 2015). Estos mecanismos favorecen el control de hongos fitopatógenos (Jensen y Wolffhechel, 1995; Martínez *et al*., 2013; Candelero *et al*., 2015). La combinación de estas estrategias muestra efectos sinérgicos, lo cual es especialmente importante en condiciones de campo. En este experimento, se observó que la aplicación en campo con algunas de las cepas de *Trichoderma* aisladas logró disminuir la incidencia y severidad de *H. vastatrix*, lo cual contribuyó a la reducción del daño por roya en hojas de café. Además, se ha reportado la actividad antagónica *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. hacia hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides y Alternaria alternata*, con porcentajes de inhibición superiores al 60 %. Por lo tanto, *Trichoderma* representa una alternativa para el control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Rubio-Tinajero *et al*., 2021; Savin-Molina *et al*., 2021). En general, el desempeño de una cepa de *Trichoderma* en el campo es el resultado de diferentes estrategias, como la competencia, la antibiosis y el micoparasitismo, que influyen en su capacidad para controlar los fitopatógenos. Por lo tanto, el uso de consorcios de cepas puede ser una buena opción para potenciar el efecto de cada una de ellas (Pérez *et al*. 2015).

Lecanicillium spp., el segundo hongo antagonista que se evaluó en este experimento, se ha utilizado como agente de control biológico en regiones tropicales. Sin embargo, es necesario considerar el efecto de factores abióticos como la humedad relativa (HR) y la temperatura para seleccionar cepas con mayor potencial como agentes microbianos fúngicos (Kamney, 2008). Alavo y Accodji (2004) informaron que la eficacia de *L. lecanii* es mayor en condiciones de alta humedad relativa, lo que puede limitar su eficacia, especialmente en condiciones de campo con ambientes secos o de baja HR. Por otro lado, Ayala-Zermeño *et al*. (2020) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas en el crecimiento de cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia de *Lecanicillium lecanii*, observando que todos los hongos estudiados presentaron la mayor tasa de crecimiento a 25 °C y ninguno creció a 35 °C, lo cual sugirió que este micoparásito es más tolerante a temperaturas más frescas, ya que encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los cultivos polispóricos, monospóricos y cepas de referencia a 15, 25 y 30 °C, lo que indicó la variabilidad intraespecífica del hongo. Para el caso de este experimento, se determinó que las cepas de *Lecanicillium* disminuyeron de manera significativa la incidencia y severidad de *H. vastatrix*, estos efectos probablemente pudieron estar asociado a las temperaturas que prevalecieron en el periodo que se realizaron las aplicaciones del hongo (diciembre y

enero), donde la temperatura máxima promedio fue de 29 °C en ambos meses, y la temperatura mínima promedio fue de 17 °C en diciembre y de 15 °C en enero (CONAGUA, 2024). En cuanto al control natural de la roya del café por *L. lecanii*, se ha mencionado la existencia de un mecanismo ecológico complejo que implica el mutualismo entre una hormiga (*Azteca instabilis*) y una escama (*Coccus viridis*). En este contexto, se observó que a medida que aumentaba la población de insectos, disminuía la incidencia de la roya y viceversa. La conclusión obtenida fue que, además de las condiciones ambientales, el mutualismo con insectos y otros hongos desempeñan un papel crucial en la densidad general de esporas de *L. lecanii*, favoreciendo así su presencia constante en el entorno (Cortez-Madrigal *et al*., 2003; Vandermeer *et al*., 2009).

CONCLUSIONES

La utilización de hongos antagonistas, en particular *Trichoderma* y *Lecanicillium*, podría ser una estrategia prometedora para el manejo ecológico de la roya del café. *Trichoderma*, al desplegar diversas estrategias como la competencia, antibiosis y micoparasitismo, mostró ser una alternativa valiosa con efectos sinérgicos destacados en condiciones de campo. Por otro lado, *Lecanicillium*, destacó por su potencial como agente de control biológico contra la roya, aunque se enfatiza la necesidad de tomar en cuenta los factores abióticos, como la humedad relativa y la temperatura, para optimizar su eficacia y adaptar su aplicación a las condiciones específicas del entorno. La combinación de *Trichoderma* y *Lecanicillium*, podrían ofrecer una estrategia eficaz y respetuosa con el medio ambiente para disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad, lo que significaría beneficios notables tanto en el ámbito agronómico como ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Juárez del Estado de Durango por permitirme realizar el trabajo de investigación y al CONAHCYT por el apoyo económico de la beca. Al INIFAP, Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, e INIFAP, Campo Experimental Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. Por permitirme utilizar las instalaciones y equipo, para el aislamiento, identificación y cultivo de los hongos antagonistas.

CONFLICTOS DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de interes.

REFERENCIAS

Abbott, W.S. 1987. Classic Paper: Abbott´s Formula. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal American Mosquito Control Association. 3(2): 302-303. DOI: 10.1146/annurev.en.39.010194.000323

Alavo, T.B.C. y Accodji, M. 2004. The entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Deuteromycetes, Moniliaceae). The proteins hydrophobins and the biological control of aphids (Homoptera, Aphididae): Literature review. Archives of Phytopathology and Plant Protection 37: 201-204. Doi.org/10.1080/03235400842000202210

Alomía, L.J.M. y Cosinga, E. R. 2021. Hiperparasitismo y antagonismo de *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome en cafetales de Satipo-Perú. Revista Investigación Agraria. 3(2): 49-62. Doi.org/10.47840/ReInA.3.2.1116

Arneson, P.A. 2000. Coffee rust. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02.

Arriola, M.C., Chet, I. y Rölz, C. 1998. Hongos que atacan la roya del café: Un breve comentario. Universidad Del Valle de Guatemala 8:2-6. Disponible en línea: http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volúmenes/revista8.pdf

Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Laderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. y Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): Impacts, plausible causes and propose solutions. Food Security 7(2): 302-321. Doi: 10.1007/s12571-015-0446-9.

Ayala-Zermeño M.A., Mier T., Sánchez R.J. y Toriello C. 2020. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. 2005. Revista Mexicana de Micología. 20:96-97. https://www.redalyc.org/pdf/883/88302014.pdf

Castro, A.M. y Revillas, C.A. 2005. Biorregulación de *Rhizoctonia solani* en germinadores de café. Boletín CENICAFÉ. Avance técnico No. 336. https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0336.pdf

Cervantes, E. y Estrada, E. 2018. Socialización de conocimientos del café orgánico en el contexto de espacios colectivos de grupos localizados de parentesco tseltales, Tenejapa, Chiapas. Revista de El Colegio de San Luis. 8(15): 47-75. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-899X2018000100047&script=sci_abstract

Chaín, G.A., Martínez, R.M., Cárdenas, J.M., Vilchez, M.S. y Harvey, C.A. 2019. Uso de prácticas de adaptación basada en ecosistemas por pequeños cafetaleros en Centroamérica. Agronomía Mesoamericana 30(1): 1-18. Doi.org/10.15517/am. v30i1.32615

Cortez-Madrigal, H. , Alatorre-Rosas, R., Mora-Aguilera, G., Bravo-Mojica, H., Ortiz-García, C.F., Aceves-Navarro, L.A. 2003. Caracterización de aislados multispóricos y monospóricos de Lecanicillium (=Verticillium) lecanii para el manejo de *Toxoptera aurantii* en cacao . BioControl 48 , 321-334.

Cubilla, A., Ruiz, D., Romero, M., Flores, M. y Barúa, J. 2019. Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*. Agronomía Mesoamericana 30(1): 63-77. Doi.org/10.15517/am. v30i1.3442 3

Díaz, V.V.M., Pérez, Q.J.N., Pinson, R.E.P., Magallanes, C.R., De Coss, F.M.E. y Cabrera, A.M. E. 2014. Producción de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr.) AgroProductividad. 7(3): 29-33. File:///C:/Users/Windows10/Downloads/valeria_sias,+Journal+editor,+con-4%20(2).pdf

Díaz-Vicente, V.M., Pinzón-Rincón, E.P., Pérez-Quintanilla, J.N., Cabrera-Alvarado, M.E., Magallanes-Cedeño, R., y De Coss-Flores, M.E. 2014. El hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet,

alternativa para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). AgroProductividad año 7 vol 7(3):58-62. Disponible en *Agroproductividad* III 2014.pdf (colpos.mx)

Eskes, A.B. 1983. Assesment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. Br.) In: Eskes, A. B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileai vastatrix*) Ph. D. dissertation. Wageningen (Holanda). Institute of Plant Breeding of the Agricultural University. P 4-14. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF19830873623

Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 26: 75-91. https://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188. 000451.

Gilchrist, S.L., Fuentes, D.G., Martínez, C.C., López, A.R.M., Duveiller, E., Singh, R.P., Henry, M. y García, I.A. 2005 Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D. F. CIMMYT. 68 pp. http://hdl.handle.net/10883/1272

Gómez, I., Pérez, E., Escamilla, E., Martínez, M., Carrión, G. y Hernández, T. 2018. Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología, 36(1): 172-183. Doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1708-1

González, E., y Surís, M. 2007. Selección *in vitro* de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams) para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (Berk. Et Br.). Protección Vegetal, 22(2): 128-130. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522007000200010

Gómez, D.I., Pérez, E.P. y Escamilla, P.E. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 172-183. Doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-1

Halpay, M., Silverio, L., Mateo, A., Pimentel, A. y Cueto, J. 2020. Evaluación *in vitro* de micoparásitos con potencial de control sobre la enfermedad Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en la provincia San Juan, República Dominicana. Revista Agropecuaria y Forestal. 9(2): 17-24. http://sodiaf.org.do/apf/index.php/apf/article/view/120/104.

Humber, R.A. 1997. Fungi: identification. In: Lacey L (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, California, pp 153–185.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), Censo de población y vivienda, 2010. [Consultado 27 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2010/

Jensen, D.F. y Wolffhechel, H. 1995. Biological Control: Benefits and Risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. In: The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root and damping-off diseases. M. T. H., Heikki and J. M. Lynch (Eds), pp 177-189. Cambridge: Cambridge University Press. https://www.nhbs.com/biological-control-benefits-and-risks-book

Johnson, M.A. y Manoukis, N.C. 2020. Abundance of coffee berry borer in feral, abandoned and managed coffee on Hawaii island. Journal Applied Entomology. 144(10): 920-928. Doi.org/10.1111/jen.12804

Julca Otiniano, A., Borjas Ventura, R., Alvarado Huamán, L., Julca Vera, N., Castro Cepero, V. y Bello Amez, S . 2019. Relación entre la incidencia y la severidad de la roya del café (Hemileia vastatrix) en San Ramón, Chanchamayo, Perú. Revista Ciencia e Investigación vol4 (4): 1-9. Disponible en https://doi.org/10.5281/zenodo.3477556 .

Kamnev, A.A. 2008. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. Journal of Spectroscopy 22:83-95. http://dx.doi.org/10.3233/SPE-2008-0329

León, B., Arévalo, E. y Sophie, A. 2019. Sudden death of *Theobroma cacao* L. caused by *Verticillium dahliae* Kleb. in Peru and its in vitro biocontrol. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 20(1): 133-148. Doi.org/10.21930/rcta.vol20_num1_art:1251.

Mahfund, M.C., Mior, A.Z., Meon, S. y Kadir, J. 2006. *In Vitro* and *in vivo* tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* treschow on *Hemileia vastatrix* Berk and Br. Malaysian Journal of Microbiology. 2: 46-50. Disponible en línea en: http://www.myjurnal.my/public/article-view.php?id=10291.

Moguel, P. y Toledo, V.M. 1999. Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. Conservation Biology. 13(1): 11-21. Doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.97153.x

Pérez, L., Belmonte, J.R., Núñez, H.G., Guzmán, R. y Mendoza, B. 2015. Sensibilidad in vitro de dos especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. Rev. Mex. Fitopatol. 33(2):256-267.

Pilozo, M.W., Indacochea, B.G., Castro, A.L., Vera, T. . y Ortega, J.G. 2022. Principales enfermedades causantes de la pérdida de rendimientos de los cultivos de café arábigo (*Coffea arabica* L.) en la zona sur de Manabí, Ecuador. Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. UNESUM- Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria. 6(2): 117-134. Doi:10.47230/unesum-ciencias.v6.n2.2022.632.

SAGARPA. Reporte: El café en México, diagnóstico y perspectiva. Cámara de Diputados. México. 2018. [Consultado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30El%20caf%C3%A9%20en%20M%C3%A9xico:%20diagn%C3%B3stico%20y%20perspectiva.pdf.

SAS Institute. 2010. Language and procedures. Release 9.2. SAS Institute. Cary, North Caroline, USA. https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119

SENASICA. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 40. 23 p. Ficha Técnica de Roya del cafeto. pdf (senasica.gob.mx). 2016. [Consultado 27 de abril de 2023]. Disponible en: https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya%20cafeto/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20Roya%20del%20cafeto.pdf

SENASA. 2013. Norma para la ejecucion y remision de actividades del programa manejo integrado de plagas de cafeto. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos /jer/SUB_DIR_ CONTEP/1222.pdf

SIAP. Subsistema de Información Agrícola. Información de cultivos 2019-2020. [Consultado 14 de enero de 2021] 2020. Disponible en: https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119

Siddiquee, S. 2017. Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions. 10.1007/978-3-319-64946-7.

Thalinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra, G.L., Várzea, V. y Silva, M. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia*

vastatrix: one and half centuries around the tropics. Molecular Plant Pathology. 18(8): 1039-1051. https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=en&user=EAipXUIAAAAJ&citation_for_view=EAipXUIAAAAJ:isC4tDSrTZIC

Torres, C.N.E., Melchor, M.E.M., Ochoa, S.J.S., Ramírez, M.R.A., Parra, S.R. e Iqbal, H.M.N. 2020. Impact of climate change and early development of coffee rust-An overview of control strategies to preserve organic cultivars in Mexico. Science of The Total Environment. 738(140225): 1-49. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140225.

Townsend, G.R. y Heuberger, J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. The Plant Disease Reporter. 27: 340-343. https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=725513

Vandermeer, J., Perfecto, I. y Liere, H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. Plant Pathology. 58(1): 636-641. Doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02067.x

Vidal, M.N.A., Argumedo, D.R., Sánchez, P.J.R., Chiquito, C.R.G., González, M.D. y Sánchez, V.G. 2021. Microorganismos antagonistas: una alternativa para el control biológico de enfermedades fúngicas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.). ITEA-Información Técnica Económica Agraria. 117(3): 214-226. https://doi.org/10.12706/itea.2020.042

Zare, R, y Gams, W. 2004. A monograph of Verticillium section Prostata. Rostaniha 3:1-188. Disponible en: https://rostaniha.areeo.ac.ir/issue_10457_10680.html

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Relación entre el estado nutrimental y la densidad de *Tetranychus urticae* Koch en rosa de corte (*Rosa hybrida*)

Relationship between nutrient status and density of *Tetranychus urticae* Koch in rose cut (*Rosa hybrida*)

Agustín Robles-Bermúdez[1]*✉, J. Concepción Rodríguez-Maciel[2], Porfirio Juárez-López[3], Octavio Jhonathan Cambero Campos[1]

[1] Universidad Autónoma de Nayarit. Unidad Académica de Agricultura. Km. 9 Carr. Fed. Tepic-Compostela, Xalisco, Nayarit, México.

[2] Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, México.

[3] Universidad Autónoma del Estado de Morelos- Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Av. Universidad Núm. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C. P. 62209.

ABSTRACT

The two-spotted mite, *Tetranychus urticae* Koch, is the key pest in rose cut. Preliminary observations show that plants with high density of two-spotted mite exhibit nutritional imbalance, but there is not quantitative information about it. The objective was to determine the relation between two-spotted mite´s density and nutritional status of cut rose crop 'Polo'. In four samplings, 60 spotted mite-free and 60 plants with over 60 mites per leaf (high infestation) were selected. In both cases, foliar analyses were carried out to determine the micro and macro elements as well as the Nutritional Unbalanced Index (IDN). The plants infested with two-spotted mite showed a nutritional disequilibrium due to reduced foliar concentration of nitrogen, potassium, phosphorus, calcium, manganese and copper. The percentage reduction in the concentration of these elements fluctuated between 0.3 to 29 % compared against control.

Keywords: Mites, mineral nutrition, integrated pest management.

RESUMEN

La araña roja, *Tetranychus urticae* Koch, es la principal plaga del cultivo de rosas para corte (*Rosa hybrida*). Observaciones preliminares indican que plantas con alta densidad de araña roja presentan deficiencias nutrimentales, pero no existe información cuantitativa al respecto. El objetivo fue determinar la relación que existe entre la densidad de araña roja y el estado nutrimental de rosal 'Polo'. En cuatro muestreos, se seleccionaron 60 plantas libres de araña roja y 60 plantas con más de 60 ácaros por hoja (infestación alta). En ambos casos se determinó, mediante análisis químico foliar, la cantidad de macro y micronutrimentos, así como el índice de desbalance nutricional (IDN). Las plantas con presencia de araña roja muestran desequilibrio nutrimental debido a la reducción en la concentración foliar de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, manganeso y cobre. El porcentaje de reducción de la concentración de dichos elementos osciló entre 0.3 y 29 % respecto al testigo.

Palabras clave: Ácaros, nutrición mineral, manejo integrado de plagas.

INTRODUCCIÓN

La floricultura es una de las actividades más rentables del sector agrícola. El rosal (*Rosa hybrida*) es de las especies ornamentales más comerciales y preferidos por los consumidores en fechas especiales como: 14 de febrero (San Valentín), 10 de mayo (día de las Madres), graduaciones y 12 de diciembre. En México, se cultivan 1,750 ha de rosal, que representan el 7.7 % de la superficie nacional (SIAP, 2021). Sin embargo, la actividad se ve afectada por una serie de problemas durante el desarrollo de la planta y en precosecha que afectan la calidad de los ornamentales. El primero refiere a la presencia de plagas y enfermedades que afectan la producción y la calidad comercial de los tallos florales y, por consecuencia, se aplican un mosaico de ingredientes activos para el control de los parásitos (Zacarías, 2018; García-Velazco *et al*., 2021). El segundo se refiere a los desbalances nutrimentales causados principalmente por la forma imprecisa en la aplicación e interpretación de los análisis de suelos para cultivos intensivos (Longjman *et al*., 2022; Chacón-Hernández *et al*., 2018). La desnutrición de cultivos y la presencia de plagas frecuentemente están presentes en los sistemas de producción intensiva, cuyo efecto se manifiesta por los desequilibrios y los metabolitos secundarios que las plantas producen al no disponer de los nutrientes necesarios para cumplir sus funciones bioquímicas. En esta condición, se refleja en baja calidad de los ornamentales (Carrillo-Salazar *et al*., 2019). La nutrición y el manejo de plagas, como la araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) está relacionada como el principal problema que registra el cultivo del rosal a nivel nacional y mundial (Assouguem *et al*., 2022; Golizadeh *et al*., 2017; Lara-Cortés *et al*., 2013; Otero, 2002). Un mal manejo de ingredientes activos en un programa de manejo integrado de araña roja induce el desarrollo de resistencia de ácaros a acaricidas (Stumpf y Nauen, 2002; Adesanya *et al*., 2021). En el sistema convencional de producción de flores, con base en fertilizantes sintéticos y el uso de pesticidas altamente tóxicos y contaminantes, trae como consecuencia una mayor susceptibilidad de los cultivos al ataque de plagas y enfermedades (Erhan y Nedim, 2006). Los suelos en óptimas condiciones físicas, químicas y biológicas y con alto contenido de mate-

*Autor para correspondencia: Agustin Robles Bermúdez
Correo electrónico: agustin.robles@uan.edu.mx
Recibido: 26 de octubre de 2023
Aceptado: 23 de febrero de 2024
Publicado: 08 de abril de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1878

ria orgánica son suelos biológicamente activos y de buena fertilidad, en cambio suelos con desbalances nutrimentales muestran baja diversidad de insectos, y alta abundancia de insectos plaga, debido al uso excesivo de plaguicidas y nutrimentos sintéticos (Nicholls y Altieri, 2006; Porcuna, 2007). De acuerdo con Damián-Nava *et al.* (2006), existen metodologías para la interpretación de los análisis foliares de cultivos. El primero, se conoce como Método Convencional (MC) (Mills y Jones, 1996); el segundo, es la Desviación del Óptimo Porcentual (DOP) (Montañés *et al*., 1993) y el tercero se conoce como Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) (Beaufils, 1973). El DOP cuantifica la cantidad en que un nutrimento se desvía en relación a su norma específica. En este método el valor nutrimental óptimo para cada elemento es igual a cero, de modo que los valores positivos indican excesos y los negativos deficiencias. Este método permite calcular el índice de desbalance nutrimental (IDN) que se refiere a la suma de los valores absolutos de los índices DOP y que representa el balance nutrimental total de la planta, el cual puede relacionarse con el rendimiento (Damián-Nava *et al.*, 2006).

Es probable que la alimentación de la araña roja se refleje en deficiencias nutrimentales del cultivo de la rosa de corte. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la relación entre el estado nutrimental y la densidad de *T. urticae* Koch en rosa de corte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en la comunidad de Santa Ana, municipio de Tenancingo, Estado de México, México, localizada en latitud 18°58'1" N y longitud 99°37'4" O, y altitud de 2085 m.s.n.m.

Cultivo

Se utilizó un cultivo de rosa de corte cultivar Polo de res años de edad, en el estado fenológico de producción (botón floral), en condiciones de invernadero. Con un manejo agronómico propio para la concentración de producción en noviembre o en febrero. La nutrición implementada fue realizada con la formula 12-6-12 misma que se aplicaron 30 g/m.

Muestreos

Se realizaron cuatro muestreos en marzo y abril, que fueron posteriores a la fecha de pico de producción (febrero). Los muestreos se dividieron en 10 submuestreos con frecuencia semanal. En cada submuestreo, se seleccionaron al azar cinco plantas de rosal y se recolectaron 65 hojas verdaderas. Dichas hojas se obtuvieron del área comprendida entre los 25 y 35 cm abajo del botón floral. Para cada muestreo, cinco submuestreos se realizaron sobre plantas libres de araña roja y cinco sobre plantas con al menos 60 individuos por hoja de *T. urticae*, lo que se considera como infestación alta según el criterio de Kant *et al*. (2004).

Las hojas recolectadas de plantas infestadas y no infestadas se colocaron, por separado, en bolsas de papel estraza y debidamente rotuladas para el análisis químico vegetal. Este mismo procedimiento se repitió en todos los muestreos.

Procesamiento de las muestras

De cada submuestreo se seleccionaron 100 g de hojas, las que se lavaron con agua destilada y secaron en una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C por 72 h. Posteriormente, en las hojas deshidratadas, se determinó la concentración de nitrógeno (N) por el método de Kjeldahl descrito por Bremmer y Mulvaney (1982) y las concentraciones de fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B) y manganeso (Mn) por inducción de plasma acoplado después del proceso de digestión con mezcla de ácidos perclórico, nítrico y sulfúrico (Alcántar y Sandoval, 1999).

Análisis estadístico

Mediante las metodologías aprobadas por el Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) se obtuvieron los índices nutricionales para cada elemento (Walworth y Sumner (1987). El análisis estadístico de los resultados se realizó con base a los siguientes aspectos: a) comparación de la concentración por fecha de muestreo para cada nutrimento por separado y comparación del IDN para cada elemento, b) comparación general de la concentración de nutrimentos e IDN, entre plantas no infestadas y plantas infestadas de araña roja. Se consideró cada fecha de muestreo como un bloque. Se realizaron análisis de variación de manera general a las muestras por concentración de nutrimentos e IDN. Posteriormente se realizó comparación de medias por la prueba de *t* con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mediante el sistema de análisis estadístico SAS (SAS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El complejo de la nutrición de cultivos y su relación con la presencia o ausencia de plagas cobra importancia por la producción de compuestos que tienen el potencial de incrementar la reproducción o inhibir el desarrollo de los herbivoros (Norboo *et al*., 2018; Kallure *et al*., 2022). Con excepción del muestreo III, la concentración de N fue estadísticamente inferior en plantas con alta densidad de *T. urticae* ($p \leq 0.05$) (Tabla 1). En frijol, la fecundidad y el ciclo de vida se redujeron con aplicaciones de nitrogeno en subdosis de las recomendadas, significa más ciclos de la plaga lo cual promueve un mayor número de individuos potenciales plagas del cultivo (Damghani *et al*., 2021).

La tabla 3 muestra que el nitrógeno también presentó un mayor IDN en muestras con presencia del ácaro (-20.0) que en plantas libres de esta plaga (-8.3). Estos resultados difieren con los obtenidos por Marschner (2012) quien asevera que la mayor concentración de aminoácidos favorece la presencia de insectos chupadores como áfidos y ácaros fitófagos.

Al comparar plantas libres de araña roja contra plantas con alta densidad de esta plaga, no hubo diferencias significativas en la concentración de K y P en ninguna fecha de muestreo (p

Tabla 1. Comparación de concentraciones de nutrimentos en hojas de rosal de corte 'Polo', por fecha de muestreo y categorizadas como libres de *Tetranychus urticae* o infestadas con ≥ 60 individuos por hoja (prueba de t, α = 0.05).
Table 1. Comparison of nutrient concentrations in 'Polo' cut rose leaves, by sampling date and categorized as free of *Tetranychus urticae* or infested with ≥ 60 individuals per leaf (t test, α = 0.05).

	Muestreo							
	I		II		III		IV	
Nutrimento mg kg^{-1}	Infestación Nula[1]	Infestación alta[1]	Infestación nula[1]	Infestación alta[1]	Infestación nula[1]	Infestación alta[1]	Infestación nula[1]	Infestación alta[1]
Nitrógeno	30320 ± 687 a	24220 ± 388 b (*p*=0.003)	29800±1035 a	24260±635 b (*p*=0.025)	34280±518 a	29100±1724 a (*p*=0.067)	35160±194 a	29280±530 b (*p*=0.000)
Fósforo	2499 ± 136 a	1690 ± 244 a (*p*=0.068)	2595±338 a	1891±313 a (*p*=0.259)	3037±202 a	2387±237 a (*p*=0.111)	3701±154 a	2919±168 a (*p*=0.056)
Potasio	13902 ± 1350 a	9268 ± 1146 a (*p*=0.085)	13302±1735 a	9149±1103 a (*p*=0.174)	13873±976 a	11730±1328 a (*p*=0.346)	16322±31 9a	13671±1319 a (*p*=0.124)
Calcio	11109 ± 1120 a	8048 ± 796 a (*p*=0.105)	10970±985 a	6753±677 b (*p*=0.019)	12634±1041 a	9498±918 a (*p*=0.144)	13216±1081 a	10015±479 a (*p*=0.064)
Magnesio	3421 ± 353 a	3551 ± 446 a (*p*=0.817)	3461±366 a	2503±166 a (*p*=0.079)	4095±431a	3628±327 a (*p*=0.532)	4414±233 a	4170±155 a (*p*=0.36)
Hierro	163 ± 25.9 a	169.6 ± 40.4 a (*p*=0.891)	227±44.3 a	127±10.8 a (*p*=0.102)	166±6.9 a	222±18.5 b (*p*=0.028)	295±61 a	266±42 a (*p*=0.751)
Manganeso	454 ± 70 a	309 ± 34 a (*p*=0.178)	514±82 a	221±15.0 b (*p*=0.016)	343±49 a	435±55 a (*p*=0.333)	1214±54 a	1008±86 a (*p*=0.170)
Zinc	90 ± 9.1 a	70.5 ± 9 a (*p*=0.298)	94.6±11a	60.6±4 a (*p*=0.055)	54.5±6 a	73.48±5.0 a (*p*=0.137)	182±9.4 a	165±15 a (*p*=0.513)
Cobre	26.3 ± 2.5 a	19.6 ± 2.3 a (*p*=0.176)	28.8±3.9 a	15.5±1.0 b (*p*=0,044)	162.6±15 a	97.4±4.7 b (*p*=0.007)	116.1±7.8 a	115±9.3 a (*p*=0.944)
Boro	64.9 ± 3.9 a	65.4 ± 8.3 a (*p*=0.969)	64.2±3.9 a	55±6.6 a (*p*=0.334)	65.7±15 a	76.5±8 a (*p*=0.316)	81.4±2.5 a	78.1±5.4 a (*p*=0.535)

[1]Dentro de cada fecha de muestreo y para cada nutrimento, la letra minúscula índica la significancia estadística y entre paréntesis se índica el valor de *p*.

≥ 0.05) (Tabla 1). El ciclo de vida más largo y menor fecundidad se registraron con aplicación del 60 % de la dosis normal de potasio, por consecuencia la población se reduce, específicamente en el estado biológico de ninfa. Este resultado se refiere a una etapa de alto consumo de savia lo que significa tener presente la plaga en estado biológico de alto consumo de alimento por más tiempo (Damghani *et al*., 2021). Para los muestreos III y IV se registraron deficiencias para N, K, y Ca y excesos para P, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y B (Tabla 2). De acuerdo con Huguet (1980), el que K, Mg y Ca se encuentren en sus rangos óptimos influye de manera determinante en la resistencia de la planta a desórdenes fisiológicos y patológicos.

Tabla 2. Comparación de Índice de Desbalance Nutricional (IDN) en hojas de rosal de corte 'Polo', por fecha de muestreo y categorizadas como libres de araña roja o infestadas con ≥ 60 individuos por hoja (prueba de *t*, α = 0.05).
Table 2. Comparison of the Nutritional Imbalance Index (NDI) in 'Polo' cut rose leaves, by sampling date and categorized as free of red spider mite or infested with ≥ 60 individuals per leaf (t test, α = 0.05).

	Muestreo							
	I		II		III		IV	
Nutrimento IDN	Infestación nula	Infestación alta	Infestación nula	Infestación alta	Infestación nula	Infestación alta	Infestación nula	Infestación alta
Nitrógeno	-11.6 ± 1.3	-25.9 ± 1.12	-12.3±2.7	-25.9±1.9	-4.98±0.76	-14.65±3.15	-3.68±0.27	-13.62±1.11
Fósforo	-0.4 ± 2.9	-29.8 ± 12.1	-1.5±9.5	-1.5±9.5	10.2±3.9	-4.37±6.4	22.9±2.93	7.89±3.3
Potasio	-39.4 ± 8.1	-88.5 ± 18.7	-51.0±21	-40.2±19.3	-38.2±6.2	-60.1±17.4	-23.6±1.4	-41.16±8.9
Calcio	-7.21 ± 4.2	-23.0± 6.4	-7.8±4.6	-33.5±6.7	1.9±3.5	14.6±6.2	-0.12±3.34	-10.33±2.0
Magnesio	0.39 ± 4.2	-2.87 ± 6.2	0.11±5.18	-11.57±3.6	8.0±4.3	2.51±4.1	11.2±2.35	8.8±1.57
Hierro	15.1 ± 8.3	16.4 ± 13.3	35.5±14.2	3.5±3.5	15.9±2.21	33.85±5.9	57.2±19.5	47.7±13.6
Manganeso	156.2 ± 29.7	94.5 ± 14.7	181.8±35	57.0±6.4	109.1±21	148.3±23.4	479.6±23	392.1±36.6
Zinc	28.31 ± 5.2	17.3 ± 5.3	31.0±6.22	11.76±2.24	8.25±3.5	19.02±2.87	80.86±5.4	70.94±8.5
Cobre	21.3 ± 3.5	11.3 ± 3.4	25.0±5.8	5.2±1.0	224.1±22.6	127.4±6.9	155.0±11.6	153.3±13.9
Boro	8.8 ± 2.3	8.85 ± 5.0	7.64±5.4	2.33±4.4	9.2±2.0	15.6±4.7	18.45±1.5	16.54±3.16

Tabla 3. Comparación general de concentraciones e índices nutricionales de nutrimentos en hojas de rosal de corte 'Polo' libres de araña roja o infestadas con ≥ 60 individuos por hoja. Tenancingo, Estado de México.
Table 3. General comparison of nutrients concentrations and nutritional indices in 'Polo' cut rose leaves free of red spider mites or infested with ≥ 60 individuals per leaf. Tenancingo, State of Mexico.

Nutrimento	Concentración mg kg^{-1}		Índice de Desbalance Nutricional[1]		Reducción nutrimental (%)
	Alta	Libre	Alta	Libre	
Nitrógeno	26715.0±0.0723 b[1]	32390.0±0.0651a	-20.0±1.64	-8.3±1.2	15.0
Fósforo	2222.0±157 b	2958.0±149 a	-12.0±5.3	7.8±3.4	25.0
Potasio	10955.0±709 b	14350.0±617 a	-70.0±8.9	-38.0±5.8	24.0
Calcio	8579.0±447 b	11982.2±534 a	-20.4±3.3	-4.3±1.23	29.0
Magnesio	3388.0±195 a	3848.8±189 a	-0.8±2.58	4.9±2.21	13.0
Hierro	196.1±18.7 a	212.9±22.1 a	25.37±6.03	30.9±7.07	12.0
Manganeso	493.3±74.7 b	631.2±83.9 a	173.0±31.8	231.7±35.7	22.0
Zinc	92.3±10.6 a	105.3±11.6 a	29.7±6.01	37.1±6.58	12.0
Cobre	61.9±10.6 b	83.5±14.0 a	74.2±15.7	106.3±20.8	26.0
Boro	68.8±3.9 a	69.0±2.8 a	10.8±2.4	11.0±1.76	0.3

[1]Dentro de la misma columna, los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre sí (prueba de *t*, α = 0.05).

En muestras con presencia de *T. urticae* se observó una deficiencia de -12.0 de fósforo, resultado que coincide con Wermelinger *et al*. (1991) quienes señalan que, en el cultivo de manzano (*Pyrus malus* L.), las plantas con deficiencias de este elemento presentan alta tasa reproductiva de *T. urticae*. Además, que coincide con los trabajos realizados en fresa, donde se reporta incremento de estados juveniles con deficiencia de fósforo (Ribeiro *et al*., 2012).

En plantas con presencia de araña roja, el IDN para potasio fue mayor para plantas libres de la plaga. El potasio es un elemento importante en el proceso de fotosíntesis y su deficiencia se refleja en un aumento en la tasa respiratoria de la planta. Los cambios fisiológicos y metabólicos producto de deficiencias nutrimentales y, especialmente, de potasio favorecen la susceptibilidad a plagas y enfermedades (Amtamann *et al*., 2008).

Respecto a los microelementos, por fechas de muestreo, hubo diferencias significativas para Ca ($p = 0.019$) (muestreo II), Fe ($p = 0.028$) (muestreo III), Mn ($p = 0.016$) (muestreo II) y Cu (en los muestreos II y III) ($p = 0.044$ y 0.007, respectivamente) (Tabla 1); pero, no hubo diferencias estadísticas en ninguna fecha de muestreo para Mn, Zn y B ($p \geq 0.05$) (Tabla 1).

El calcio es un componente importante de la lamela media de la pared celular en las plantas, que proporciona resistencia y solidez a dicha estructura. Las plantas con deficiencias de este elemento (- 20.4) mostraron mayor susceptibilidad al ataque de araña roja en relación a plantas con deficiencias menores (- 4.3), que no registraron presencia del ácaro. El poligalacturonato de calcio se requiere en el micelio de la lamela media de la pared celular para proporcionar estabilidad a la membrana, por lo que bajas concentraciones y deficiencias de este elemento propicia una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades (Harada *et al*., 1996).

En todos los casos, el boro presentó valores de IDN positivos, lo que indica que se encontró en exceso. Según Marschner (2012), este nutrimento es uno de los microelementos involucrados en la resistencia de plantas al ataque de ácaros y sostiene que en plantas carentes o con una concentración menor a 0.5 mg L^{-1} se afecta la formación del flavonoide cianidina, responsable de la resistencia al ataque de ácaros.

En todas las fechas de muestreo, la concentración de N, P, K, Ca, Mn y Cu fue estadísticamente inferior en plantas de rosal altamente infestadas con *T. urticae*, pero no hubo diferencias significativas para Mg, Fe, Zn, y B (Tabla 3). El IDN es mayor para los nutrimentos N, P, K en plantas con alta infestación de araña roja, con respecto a las plantas libres del ácaro. El IDN fue positivo para P y Mg en plantas libres de ácaros pero negativo cuando la planta estaba infestada. Para el resto de los nutrimentos, el desbalance fue igualmente positivo o negativo tanto para plantas libres de infestación como para plantas infestadas. Aunque, coincidentemente, los microelementos Fe, Mn, Zn, Cu y B son nutrimentos que la planta demanda en menor cantidad y el IDN fue menor en plantas con altas poblaciones de *T. urticae*.

CONCLUSIONES

Las plantas de rosal 'Polo' con alta infestación de *T. urticae* presentaron concentraciones menores de N, P, K, Ca, Mn y Cu. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para Mg, Fe, Zn, y B. El IDN fue positivo para P y Mg en plantas libres de ácaros pero fue negativo cuando la planta estaba infestada. Sin embargo, para el resto de los nutrimentos, el IDN fue inconsistente con relación al nivel de infestación de ácaros en las hojas de rosal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Nayarit por el apoyo en la convocatoria: "Fortalecimiento al Posgrado de Calidad con recursos provenientes del Impuesto Especial del 12% destinado a la UAN, Patronato 2022".

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe conflicto de interes

REFERENCIAS CITADAS

Adesanya, A.W., Lavine, M.D., Moural, T.W., Lavine, L.C., Zhu, F. y Walsh. D.B. 2021. Mechanisms and management of acaricide resistance for *Tetranychus urticae* in agroecosystems. Journal of Pest Science, 94(3), 639-663.

Alcántar, G.G. y M. Sandoval-Villa M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación Especial Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, México. 156 p.

Alvarado-Camarillo, D., Valdez-Aguilar, L.A., Alba-Romenous, K., Martínez-Amador, S.Y., Hernández-Pérez, A. 2018. Accumulation and remobilization of Calcium, Magnesium and Phosphorus in Rose plants Acumulación y removilización de Calcio, Magnesio y Fósforo en plantas de Rosal. Revista Bio Ciencias, 5(1):322-327.

Amtamann, A., Trouflard S., y Armengaud, P. 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. Physiologia Plantarum 133:682-691.

Bai, C., Reilly C.C. y Wood, B.W. 2006. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. Plant Physiol. 140:433-443.

Bentz, J.A., Reeves, J., Barbosa, P. y Francis, B. 1995. Nitrogen fertilizer effect on selection, acceptance, and suitability of *Euphorbia pulcherrima* (Euphorbiaceae) as a host plant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Enviromental Entomology 24:40-45.

Beaufils, E.R. 1973. Diagnosis and recommendation integrated system (DRIS). Soil Science Bulletin 1. University of Natal. Pietermaritzburg. South Africa.

Bilal, H.H., Tahir, R., Adnan, M., Ali, S.M., Islam, H., Umer, M.S. y Iftikhar, M. 2020. ¿La aplicación foliar de macro y micronutrientes tiene algún impacto en la producción de rosas? Una revisión. Annals of Reviews and Research. 6 (1), 555677.

Bremmer, L.M. y Mulvaney C.S. 1982. Total nitrogen. p. 595-634. In: Miller R H, Keeney D R (eds) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties ASA, S.S.A. Madison, Wisconsin, USA, 1692p.

Bush, J.W. y Larry, P.P. 1999. Mixture models of soybean growth and herbivore performance in response to nitrogen-sulfur-phosphorous nutrients interactions. Ecological Entomology 24: 132-145.

Carrillo-Salazar, J.A., González-Camacho, J.M., San Juan-Martinez, E. y Gonzalez-Hernandez V.A. 2019. Quality assessment of potted petunia based on a probabilistic neural network classifier. Agrociencia (Montecillo), 53(6), 895-910.

Chacón-Hernández, J.C., Camacho-Aguilar, I., Cerna-Chavez, E., Ordaz-Silva, S., Ochoa-Fuentes, Y.M. y Landeros-Flores, J. 2018. Effects of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae: Phytoseiidae) on the chlorophyll of rosal plants (*Rosa* sp.). Agrociencia, 52(6), 895-909.

Chen, Y, Opit G.P., Jonas V.M., Williams, K.A., Nechols J.R. y Margolies, D.C. 2007 Environmental factors affecting the life-tables of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) III. Host-plant nutrition. J. Econ. Entomol. 12:1821-1830.

Damghani, M., Asadi, M. y Khanamani, M. 2021. Effect of different fertilizer regimes on life table parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on resistant bean cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology, 23(4), 853-863.

Damián-Nava, A., González-Hernández V.A., Sánchez-García P. y Livera-Muñoz M.. 2006. Dinámica y diagnóstico nutrimental del guayabo en Iguala, Guerrero, México. Terra Latinoamericana. 24(1): 125-132.

Díaz-Arias, K.V., Rodríguez-Maciel, J.C., Lagunes-Tejeda, Á., Aguilar-Medel, S., Tejeda-Reyes, M.A. y Silva-Aguayo, G. 2019. Resistance to abamectin in field population of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) associated with cut rose from state of Mexico, Mexico. Florida Entomologist, 102(2), 428-430.

Erhan, G.M. y Nedim A. 2006. Growth promoting of some ornamental plants by root treatment with specific fluorescent *Pseudomonads*. Journal of Biological Sciences. 6: 610-625.

Folegatti, M.V., Casarini, E. y Blanco, F.F. 2001. Profundidades del agua de riego de invernadero en relación con las calidades de los tallos y brotes de rosas. Scientia Agrícola , 58 , 465-468.

García-Velasco, R., Mora-Herrera, M.E., Mejía-Carranza, J., Aguilar-Medel, S. y González-Millan, M.E. 2021. Fosfitos de potasio en el manejo de Peronospora sparsa Berkeley y calidad floral del cultivo de rosa cv. Samouraï®. Acta Agrícola y Pecuaria, 7(1).

Golizadeh, A., Jafari-Behi, V., Razmjou, J., Naseri, B. y Hassanpour, M. 2017. Population growth parameters of rose aphid, *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Aphididae) on different rose cultivars. Neotropical entomology, 46(1), 100-106.

Harada, H., Takahashi, H., Matsuzaki, T. y Hagimori, M. 1996. Calcium chloride as a major component contributing to aphid resistance of *Nicotiana benthamiana*. J. Chem. Ecol. 22: 1579-1589.

Hoffland, E., Dicke, M., Van Tintelen, W., Dijkman, H. y Van Beusichem, M.L. 2000. Nitrogen availability and defense of tomato against two-spotted spider mite. Journal of Chemical Ecology. 26(12): 2697-2711.

Huerta, A.J. y Murphy, T.M. 1989. Efectos del pH extracelular sobre la salida de K^+ inducida por UV de células de rosas cultivadas. Fisiología vegetal. 90 (2), 749-753.

Huguet, C. 1980. Effects of the supply of calcium on the composition and the susceptibility of golden delicious apples to physiological and pathological disorders. Acta Hort. 92: 93-98.

Kallure, G.S., Kumari, A., Shinde, B.A. y Giri, A.P. 2022. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. Phytochemistry, 193, 113008.

Kant, M., Ament R., Sabelis, M.W., Haring, M.A. y Schuurink, R.C.S. 2004. Differential timing of spider mite induced direct and indirect defense in tomato plants. Plant Physiol. 135: 483-495.

Kwon, O.H., Choi, H.G., Kim, S.J., Lee, Y.R., Jung, H.H. y Park, K.Y. 2022. Changes in Yield, Quality, and Morphology of Three Grafted Cut Roses Grown in a Greenhouse Year-Round. Horticulturae, 8(7), 655.

Landeros. J., Guevara, L.P., Badii, M.H., Flores, A.E. y Pámanes, A. 2004. Effect off different densities of the Two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* on CO_2 assimilation, transpiration, and stomatal behavior in rose leaves. Exp. Appl. Acarol. 32: 187-194.

Lara-Cortés, E., Osorio-Díaz, P., Jiménez-Aparicio, A. y Bautista-Baños, S. 2013. Contenido nutricional, propiedades

funcionales y conservación de flores comestibles: Revisión. Archivos latinoamericanos de nutrición, 63(3), 197-208.

Longjam, R., Huirongbam, K., Kamboj, S., Jakhar, A. S. y Singh, S. 2022. Post harvesting and value addition in rose. The Pharma Innovation Journal 2022; SP-11(6): 1820-1823

Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. Revista internacional de contaminación ambiental, 23(4), 185-200.

Marschner, P. 2012. Mineral nutrition of higher plants. Third edition. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA. 651 p. https://www.sciencedirect.com/book/9780123849052/marschners-mineral-nutrition-of-higher-plants

Mills, H.A. y Benton, J.J. 1996. Plant analyses Handbook II. MicroMacro Publishing Inc, 279 p.

Mithöfer, A. y Boland, W. 2008. Recognition of herbivory associated molecular patterns. Plant Physiol. 146:825-831.

Mukhammadiev, B.K. y Khasilava, N.A. 2020. R**o**sa and integrated pest control measures. International Scientific and Technical Journal "Innovation Technical and Technology, 1(2): 33-36.

Nicholls, C. y Altieri, M. 2006. Manejo de la fertilidad de suelos e insectos plaga: armonizando la salud del suelo y la salud de las plantas en los agroecosistemas. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 77: 30-35.

Norboo, T., Ahmad, H., Shankar, U., Ganai, S.A., Kumar, M. y Stanzin Landol, B.K. 2018. Screening for resistance in rose against red spider mite, *Tetranychus urticae* (Linn.). J Entomol. Zool. Studies, 6(3), 897-899.

Ortega-Arenas, L. D., Miranda-Aragón, D. y Sandoval-Villa, M. 2006. Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus. con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. Agrociencia 40: 363-371.

Otero, C.G. 2002. Ácaros plaga de cultivos ornamentales. p. 8-24. In: Bautista N, Alvarado J, Chavarín J, Sánchez H. (eds) Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Montecillo, Texcoco, México. 237 p.

Porcuna, J.L. 2007. Producción integrada: Una estrategia de tránsito hacia sistemas más sostenibles. Ecosistemas 16:1-8.

Ribeiro, M.G.P.D.M., Michereff Filho, M., Guedes, Í.M., Junqueira, A.M.R. y de Liz, R.S. 2012. Efeito da adubação química na infestação do ácaro rajado e na produção do morangueiro. Horticultura Brasileira, 30, 673-680.

Sandoval, C. y Lolas, M. 2008. Estado nutricional de las plantas y su incidencia en la expresión de enfermedades. p.141-167. In Hirzel, J. (ed) Diagnóstico nutricional y principios de fertilización en frutales y vides. Publicaciones INIA. Chillán. Chile, 295p.

Santamaria, M.E., Arnaiz, A., Rosa-Díaz, I., González-Melendi, P., Romero-Hernandez, G., Ojeda-Martínez, D.A. y **Díaz, I. 2020.** Plant defenses against *Tetranychus urticae*: mind the gaps. Plants. 9(4): 464

Statistical Analysis System (SAS). 2009. SAS for Windows. Version 9.1. Cary, N. C. United States.

Schwachtje, J. y Baldwin, T. 2008. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? Plant Physiol. 146:845-851.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/ (Recuperado el 15 de julio del 2022).

Silva, A.G., Rodríguez, M. J.C. y Figueroa, C.I. 2008. Fertilización y Artropodofauna asociada a las especies vegetales. p.171-191. In: Hirzel, J. (ed) Diagnóstico nutricional y principios de fertilización en frutales y vides. Publicaciones INIA. Chillán. Chile, 295p.

Souza, V., Ventura, M.U., Hoshino, A.T., Hata, F.T. y Constantino, L.V. 2021. Development and population growth of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) on strawberry fertilized with different doses and sources of organic fertilizers. International Journal of Acarology, 47(6): 528-535

Stumpf, N. y Nauen, R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pest. Biochem. and Physiol. 72: 111-121.

Walworth, J.L. y Sumner, M.E. 1987. The Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS). In: Stewart, B.A. (eds) Advances in Soil Science. Advances in Soil Science, vol 6. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4682-4_4

Wermelinger, B., Oertli, J.J. y Baumgärtner, J. 1991 Environmental factors affecting the life-tables of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) III. Host Plant Nutrition. Exp. Appl. Acarol. 12: 259-274.

Zacarias-Guale, J.C. 2018. Evaluación de la productividad y calidad del cultivo de rosas (*Rosa* spp.) variedad Freedom bajo aplicaciones de biol, cantón cotacachi (Bachelor's thesis).

Zhi, J., Margolies, D.C., Nechols, J.R. y Boyer, J.E. 2006. Host-plant-mediated interaction between populations of a true omnivore and its herbivorous prey. Entomologia Experimentalis et Applicata. 121: 59-66.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Comportamiento de *Cucurbita pepo* L. var. "Grey Zucchini", en la propagación de hongos micorrizógenos arbusculares nativos de suelos con diferente manejo

Behavior of Cucurbita pepo L. var. "Grey Zucchini", in native arbuscular mycorrhizal fungi propagation in soils with different management

José Alberto Gío-Trujillo[1]*✉, Carlos Juan Alvarado-López[2], Neith Aracely Pacheco-López[3], Jairo Cristóbal-Alejo[1], Arturo Reyes-Ramírez[1], Juan Candelero-de la Cruz[4]

[1] Tecnológico Nacional de México, campus Conkal, Avenida Tecnológico s/n C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México.
[2] Cátedras-CONACYT. Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal. Avenida Tecnológico s/n C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México.
[3] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Unidad sureste. Tablaje Catastral 31264, Kim. 5.5, Carretera. Sierra Papacal-Chuburna Puerto. Parque Científico. Tecnológico de Yucatán. C.P. 97302. Mérida, Yucatán, México.
[4] Tecnológico Nacional de México, Campus Tizimín. Final Aeropuerto Cupul s/n, Col. Santa Rita, CP 97700, Tizimín, Yucatán, México.

RESUMEN

La simbiosis entre los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las plantas, representa una alternativa importamte para incrementar los rendimientos en los cultivos agrícolas. El objetivo del estudio fue evaluar la propagación de HMA aislados de suelos con diferente manejo e inoculado en *Cucurbita pepo* var. "Grey Zucchini". Se estableció un cultivo trampa como medio de propagación de HMA. Se empleó un diseño en bloques (cinco tratamientos x15 repeticiones). Los HMA nativos fueron provenientes de tres sistemas (T1 = vegetación secundaria; T2 = sistema multipropósito; T3 = sistema agrícola). Se usó un control positivo (CP = GLUMIX®MICORRIZAS) y control negativo (CN = sin inoculación). La inoculación micorrízica inició en semillero, empleando Peat Moss-suelo estéril (50:50 v/v). Se empleó como método de inoculación el método por sustrato con 12.5 g de inoculante nativo (T1 = 46 esporas; T2 = 32 esporas y T3 = 22 esporas). En CP empleó 5 g de producto 100 esporas. Los resultados indican que la mayor propagación micorrízica se presentó en el CP y T1, con una multiplicación de esporas de 135.20 ± 26.24 y 74.67 ± 5.56 esporas en 10 g de suelo. Identificando un consorcio nativo conformado de esporas de HMA de las familias Glomaceae y Gigasporacea. En conclusión, *C. pepo* representa un prometedor hospedero para el trampeo y multiplicación de los HMA.

Palabras Clave: Hongos micorrizícos, cultivo trampa, esporas, colonización, inoculación

ABSTRACT

The symbiosis between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants represents an important alternative to increase yields in agricultural crops. The objective of the study was to evaluate the propagation of AMF isolated from soils with different management, and inoculated in *Cucurbita pepo* var. "Grey Zucchini." A trap culture was established as a means of AMF propagation and a block design was used (five treatments x 15 repetitions). The native AMF came from three systems (T1 = secondary vegetation; T2 = multipurpose system; T3 = agricultural system). A positive (CP = GLUMIX-®MICORRIZAS) and negative (CN = no inoculation) control were used. Mycorrhizal inoculation began in the seedbed, using Peat Moss-sterile soil (50:50 v/v). The substrate method with 12.5 g of native inoculant (T1 = 46 spores; T2 = 32 spores and T3 = 22 spores) was used as the inoculation method. In CP, 5 g of product = 100 spores were used. The results indicate that the greatest mycorrhizal propagation occurred in CP and T1, with a spore multiplication of 135.20 ± 26.24 and 74.67 ± 5.56 spores in 10 g of soil, and identifying a native consortium made up of AMF spores from the *Glomaceae* and *Gigasporacea* families. In conclusion, *C. pepo* represents a promising host for the trapping and multiplication of AMF.

Keywords: Mycorrhizal fungi, trap culture, spores, colonization, inoculation

INTRODUCCIÓN

En México, la insuficiencia alimentaria es el principal indicador en el atraso en desarrollo cognitivo, físico y social, influyendo directamente en la salud pública y bienestar socioeconómico (FAO, 2017). Entre el 40-45 % de la población rural y urbana presentan un acceso insuficiente a alimentos con calidad nutricional (Gutiérrez *et al*., 2012), considerando al sure y seureste del país, como uno de los principales puntos deficientes en el consumo de alimentos ricos en zinc y hierro (Ramírez-Jaspeado *et al*., 2020). Incrementar los rendimientos de cultivos y el acceso de alimentos con altos aportes nutrimentales, ayuda a combatir la creciente demanda alimentaria y el acceso insuficiente de alimentos de calidad en zonas prioritarias (OMS, 2018).

La calabacita *Cucurbita pepo* es un importante recurso fitogenético de valor cultural (componente estructural de

*Autor para correspondencia: José Alberto Gío-Trujillo
e-mail: DD20800277@conkal.tecnm.mx
Recibido: 23 de febrero de 2023
Aceptado: 31 de enero de 2024
Publicado: 23 de febrero de 2024

los sistemas de producción tradicional) y económico en México (Egularte *et al*., 2018). La calabacita var. "Grey Zucchini", específicamente es la variedad económicamente más importante, por su alto interés agroalimentario, al ocupar la quinta posición en producción a nivel mundial con más de 700,000 ton por año (2.6 % de la producción mundial) (FAO, 2022). En México, se encuentra entre los ocho principales cultivos agrícolas en producción y consumo anual per cápita (1 kg/año) (SIAP, 2022). Por lo tanto, es importante proponer prácticas eficientes en el manejo de este cultivo para un mayor desarrollo vegetal que incrementen rasgos agronómicos, para el fortalecimiento de su sustentabilidad y combatir la insuficiencia alimentaria (Montenegro-Gómez *et al*., 2017).

La asociación de comunidades de microorganismos benéficos del suelo empleadas como técnicas agronómicas, es considerada una estrategia novedosa por su potencial uso, sostenibilidad y afinidad en casi todos los cultivos agrícolas (Upadhayay *et al*., 2022). La simbiosis de hongos formadores de micorrizas arbusculares con cultivos de interés agrícola, es una de las estrategias productivas que permite mejorar los atributos agronómicos de los cultivos, incrementando los rendimientos y la calidad del fruto (Lehmann, y Rillig, 2015). En los suelos tropicales los hongos micorricícos arbusculares (HMA) representan una fracción importante (Brundrett y Tedersoo, 2018). La aplicación de HMA en la agricultura se efectúa por medio de inoculación de cepas nativas y/o comerciales, propagadas mediante el método de cultivo trampa, considerando al cultivo en sustrato sólido, como la técnica con mayor propagación masiva de esporas (Berruti *et al*., 2016). No obstante, la principal problemática idntificada en la multiplicación de HMA en cultivos trampa, es la capacidad micotrófica del hospedero, método de inóculación y obtención de cepas inoculantes de HMA (Habte y Osorio, 2001). El uso de cepas inoculantes nativas de HMA, representa una mayor plasticidad bioogica y diversidad funcional de los HMA a las condiciones autóctonas del suelo. Reflejandose en una mayor sustentabilidad de los sistemas agrícolas (reducción de costos, producción vegetal, etc.) (Cruz *et al*., 2014; Aguilar-Ulloa *et al*., 2016). Para determinar la especie hospedera se han tomado en cuenta atributos clave para aumentar los procesos de multiplicación de HMA. Por ejemplo, se emplean especies con capacidad micotrófica (Yao *et al*., 2010), adaptadas a las condiciones edafoclimáticas, de manejo moderado (Cuenca *et al*., 2003) y de crecimiento rápido, ya que ciclos prolongados de un cultivo, limitan la prevalencia de esporas de HMA (Trejo-Aguilar *et al*., 2013). En estudios previos sobre *C. pepo* asociada con HMA, frecuentemente se utilizan inóculos comerciales, con el propósito de mejorar los rendimientos, producción y aspectos organolépticos del fruto (Díaz-Franco *et al*., 2016; Alvarado-Carrillo *et al*., 2018). La asociación con cepas nativas de HMA ha sido poco evaluada, especialmente como hospedero para la propagación de esporas de HMA (Esquivel-Quispe *et al*., 2021). Una de las ventajas de utilizar a un cultivo como hospedero para la propagación micorrízica previo a su establecimiento en campo es generar inóculos con mayor afinidad y probabilidad de establecimiento naturales, garantizando su interración y efectividad simbiótica. El objetivo del estudio fue evaluar la propagación de hongos micorrizogénos arbusculares provenientes de suelos con diferente manejo. inoculados en plantas de *C. pepo* var. "Grey Zucchini".

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del inoculo micorrízico

Se seleccionaron tres sistemas definidos como un sistema de vegetación secundaria (VS), agrícola (SA), multipropósito (SMP), localizados en Conkal, Yucatán, México**;** donde los atributos de las zonas se determinaron de acuerdo con el tipo de manejo y vegetación (Durán-García *et al*., 2016) (Tabla 1). En cada una de ellos se muestrearon cinco sitios (Figura 1). La toma de muestras se realizó en temporada de sequía (marzo-abril de 2021), temporalidad con mayor incidencia de esporas, esporulación e interacción con la zona radicular (Barriga, *et al*., 2011). El tamaño de muestra consistió en nueve muestras de suelo, a una profundidad de 0-20 cm, empleando un muestreo aleatorio sistemático (Bautista *et al*., 2011). Posteriormente, las nueve muestras se homogenizaron en tres muestras compuestas por sitio de estudio. El suelo fue trasladado al Laboratorio de Suelo, Agua, Planta del TECNM, Campus Conkal, secado al aire libre hasta peso constante y tamizado a 2 mm para su posterior análisis. Las zonas de obtención del inóculo nativo se caracterizaron de acuerdo con sus parámetros fisicoquímicos del suelo. El contenido mineral se realizó por el método de fluorescencia de rayos X (μ-XRF).

Tratamientos

El material vegetal fueron semillas criollas de *Cucurbita pepo* var. "Grey Zucchini", HYDRO ENVIROMENT®, sembradas en charolas con capacidad de 50 g por cavidad, empleando una mezcla de sustrato Peat Moss y suelo estéril (Luvisol, IUSS, 2015) en relación 50:50 (v/v). Se empleó oxidación por H_2O_2 al 2.24 % como método de esterilización (Cuervo-Usán *et al*., 2014).

Tabla 1. Comparativo de los atributos (manejo) y tipo de vegetación de los sistemas seleccionados para la obtención del inoculante micorricíco.
Table 1. Comparison of the attributes (management) and vegetation type of systems selected to obtain the mycorrhizal inoculant.

Atributo	Sistema multipropósito	Sistema de producción agrícola	Vegetación secundaria
Vegetación	Vegetación subcaducifolia, perenne, costera, ornamental (epifitas, cactáceas, etc.).	Vegetación secundaria con diferente enfoque productivo hortícola, frutal, forrajero, de grano, etc.).	Selva baja caducifolia (SBC)
Manejo	Manejo que involucra quemas localizadas y manejo de arvenses, etc.	Historial de manejo que involucra quemas, labrado, aplicación de fertilizantes y control de arvenses.	Sitios de extracción selectiva (tala). Entre 10-15 años de barbecho

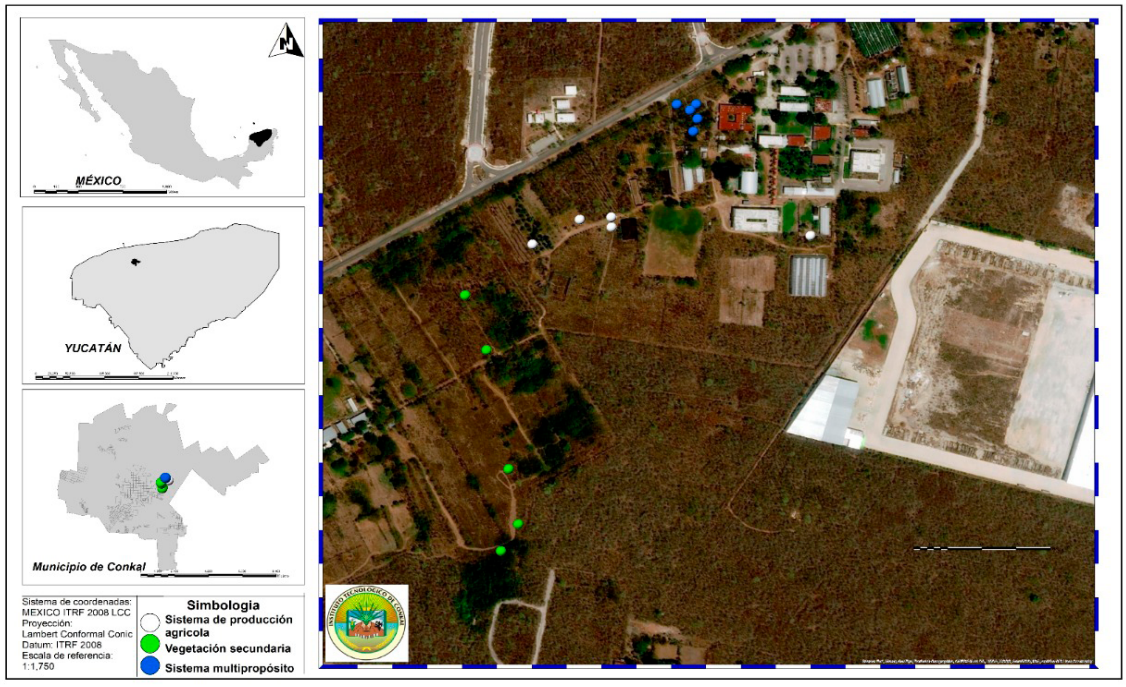


Figura 1. Localización de los tres sistemas con diferente manejo seleccionados para la obtención del inóculo micorrizico arbuscular.
Figure 1. Location of the three systems with different management selected to obtain the arbuscular mycorrhizal inoculum.

Los tratamientos del estudio corresponden a consorcios nativos de HMA provenientes de una vegetación secundaria (T1), sistema multipropósito (T2) y sistema agrícola (T3). Para el estudio se emplearon dos grupos control, un control positivo (CP), empleando un producto comercial de consorcios micorrizícos (GLUMIX®, BIOKRONE) y un control negativo (CN), sin inoculación micorricíca. La inoculación de los tratamientos inició desde la etapa de semillero, empleando el método de inoculación por sustrato (Habte y Osorio, 2001). Aplicando 12.5 g de sustrato inoculante por cavidad (semillero). Previo a la aplicación del inóculo, se realizó un conteo de esporas por tratamiento. Por lo tanto, T1 = 46 esporas; T2 = 32 esporas y T3 = 22 esporas. En CP se empleó 5 g de producto 100 esporas. El producto comercial GLUMIX®, BIOKRONE, presenta una formulación compuesta solamente de esporas seleccionadas de HMA, de las especies *Glomus geosporum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus constrictum*, *Glomus tortuosum*, *Glomus intraradices*.

Establecimiento del cultivo trampa

Se estableció en invernadero el cultivo trampa en sustrato sólido (Sieverding, 1990), durante el ciclo febrero-mayo de 2022. El trasplante del semillero se realizó a los 17 días después de la siembra (DDS) en bolsas plásticas (20 x 20 cm), con 2.5 kg de sustrato por bolsa, distribuidas a distancia de 50 x 90 cm. Como sustrato sólido se empleó sustrato estéril (oxidación por H_2O_2 al 2.24 %). El sustrato presentó un pH neutro (6.9) y una textura media (Franco-Limoso) de acuerdo a la NOM- 021-RECNAT-2000. El cultivo trampa se estableció a los 66 DDS, realizando muestreos destructivos de raíz y suelo. El manejo agronómico consistió en un riego manual a razón de 400 ml por planta, manteniendo la humedad en capacidad de campo hasta el inicio de la floración (33 DDS), restringiendo los riegos para fomentar el estrés en la planta, incentivar la simbiosis y acelerar la esporulación micorrízica. No se realizó fertilización química y control fitosanitario para evitar cualquier efecto adverso al establecimiento de la simbiosis y su composición. La temperatura durante todo el estudio en condiciones controladas de irradiación osciló en promedio en 29.5°C, con máxima de 30.2 y mínima de 28.5°C. La humedad relativa fue de 50.66 % en promedio.

Evaluación del potencial micorrízico

Para evaluar la densidad de esporas por medio del protocolo de tamizado en húmedo y centrifugación en sacarosa al 60 % (Gerdemann y Nicolson, 1963). Por su parte, se empleó el método de Sieverding (1983) para el conteo manual de esporas. La identificación de esporas se realizó a nivel de familia, agrupándolas de acuedo a los parámetros morfológicos de su color, agrupaciones (aglomeradas o solitarias), estructura de las paredes e hifa de sostén. Asimismo, el morfotipo (M) se diferenció de acuerdo con la clasificación taxonómica *Phylogeny and taxonomy of Glomeromycota*.

Diseño experimental

El diseño del estudio consistió en un diseño en bloques, distribuidos en cinco tratamientos con 15 repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados a través de una ANDEVA y se determinaron las diferencias estadísticas por el método de Tukey ($p \leq 0.05$), empleando el software InfoStat/L 2020, FCA-UNC, Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de las zonas de estudio

Las zonas evaluadas como fuente para la obtención de inóculos nativos de HMA presentaron atributos heterogéneos entre sí (Tabla 1). Los suelos presentaron tonalidades pardo oscuro-rojizo, agrupándolos en Leptosol litico (IUSS, 2015) y Haylu´um, (nomenclatura maya) por su coloración, profundidad, pedregosidad y fisiografía (Bautista, 2021). La caracterización física no presentó variaciones estadísticas (Tabla 2). En contraste, los parámetros químicos presentaron diferencias significativas en materia orgánica (p≤0.0006), conductividad eléctrica (CE) (p≤0.0001) y en el contenido mineral, específicamente, en el Potasio (K) (p≤0.0190), Calcio (Ca) (p≤0.0010), Hierro (Fe) (p≤0.0003), Molibdeno (Mo) (p≤0.0005) y Cobre (Cu) (p≤0.004) (Tabla 2 y 3). De acuerdo con los parámetros del suelo, las zonas se identifican como suelos con porosidad alta (>60%), ricos en materia orgánica (>8%) y se agrupan como ligeros/bajo, al presentar una textura media, densidad aparente de entre 0.13 y 0.15 g/cm^3, CE ligeramente salina, pH ligeramente alcalino y textura Franco Limoso (Arena 10%-limo 60 %-arcilla 30 %) (NOM- 021-RECNAT-2000). Los resultados nos indican similitudes con lo reportado por Borges-Gomes *et al*. (2014), al determinar en la misma zona fisiográfica del estado de Yucatán, suelos de textura ligera (Franco limosos), valores similares de porosidad (63-65%), que involucran una densidad aparente baja. Características propias de suelos Leptosol nudilítico/líticos, de poca retención de agua y poca profundidad (Bautista, 2021). Lo que implica una heterogeneidad en propiedades químicas del suelo a pesar de corresponder a la misma zonificación de Yucatán, relacionados directamente con una mayor aireación y drenaje en el suelo, lo que implicaría mayores fluctuaciones en sus propiedades químicas y físicas (Borges-Gomes *et al*., 2014).

Obtención del inóculo micorrízico nativo

En las tres zonas muestreadas para la obtención del inoculante nativo de HMA se registraron diferencias estadísticas en el número de esporas entre cada uno de los sitios de estudio (p≤0.0001), contabilizando un total de 1,206 esporas (26.8 ± 11 esporas) en las 135 muestras de suelo seco analizadas (10g de suelo por muestra). La vegetación secundaria aportó 554 (18.27 ± 6.55) esporas nativas de HMA, representando la zona de estudio con mayor número de esporas de HMA cuantificadas. Seguido del sistema multipropósito, con 378 (25.20 ± 6.45) esporas de HMA identificadas (Figura 2). Con relación a las zonas de muestreo, el 45.94 % del inóculo micorrízico nativo obtenido de las tres zonas de muestreo fue cuantificado en un ecosistema de vegetación secundaria. En este contexto, la vegetación secundaria representa un importante resorvorio de material biológico para ser empleado como inoculantes de HMA. Lo anterior concuerda

Tabla 3. Composición mineral de los suelos muestreados para la obtención del inóculo micorrizico arbuscular.
Table 3. Mineral composition of soils sampled to obtain the arbuscular mycorrhizal inoculum.

ID	Minerales totales (ppm)						
	P	K	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu
SPA	1212 a	59281 b	112176 c	457785 a	6438 a	1537 a	1872 a
SMP	1327 a	70509 a	227925 b	457785 a	6438 a	1361 a	570 b
VS	988 a	61101 b	310393 a	384137 b	4767 b	1230 a	587 b

Medias ± D.E.; Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes (p ≤ 0.05); SPA = Sistema de producción agrícola; SMP = Sistema multipropósito; VS = Vegetación secundaria.
Means ± SD; Means with a letter in common are not statistically different (p ≤ 0.05); SPA = Agricultural production system; SMP = Multipurpose System; VS = Secondary vegetation.

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos de los suelos muestreados para la obtención del inóculo micorrizico arbuscular.
Table 2. Physical and chemical parameters of soils sampled to obtain the arbuscular mycorrhizal inoculum.

ID	Descripción física			Descripción química		
	Densidad aparente (g/cm^3)	Porosidad (%)	Textura	Materia orgánica (%)	pH	CE (ds/m)
SPA	0.13±0.06 a	61.34±8.71 a	Franco limoso	9.53±1.19 b	7.24±0.22 b	47.90±8.92 c
SMP	0.12±0.03 a	63.41±5.08 a	Franco limoso	8.60±1.06 b	7.27±0.06 ab	64.13±7.70 b
VS	0.15±0.02 a	66.73±4.35 a	Franco limoso	10.87±2-03 b	7.39±0.13 a	78.89±16.44 a

Medias ± D.E.; Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes (p ≤ 0.05); SPA = Sistema de producción agrícola; SMP = Sistema multipropósito; VS = Vegetación secundaria.
Means ± SD; Means with a letter in common are not statistically different (p ≤ 0.05); SPA = Agricultural production system; SMP = Multipurpose System; VS = Secondary vegetation.

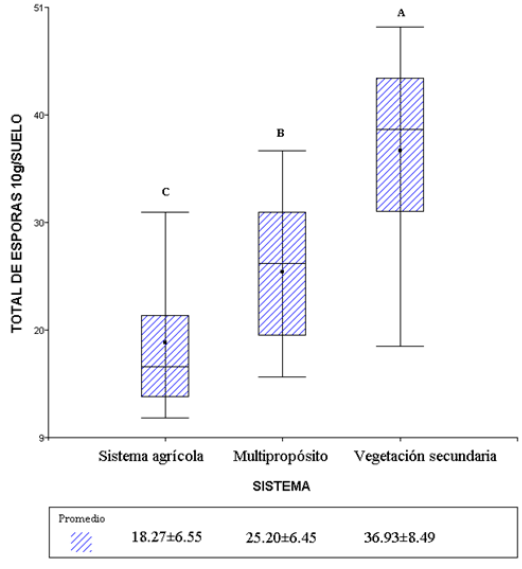


Figura 2. Números de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en 10 g de suelo, cuantificadas en los sistemas seleccionados para la obtención de los inóculos de hongos micorrizícos arbusculares. Medias ± D.E.; Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes (p ≤ 0.05).
Figure 2. Numbers of spores from arbuscular mycorrhizal fungi in 10 g of soil, quantified in the selected systems to obtain inoculums of arbuscular mycorrhizal fungi. Means ± SD; Means with a letter in common are not statistically different (p ≤ 0.05).

con Ramos-Zapata *et al*. (2013) en un estudio en ecosistemas secundarios, al registrar una densidad de esporas similar con 565 esporas en suelo rizosférico de plantas estructurales de los ecosistemas en recuperación. Lo que implica que las comunidades de HMA y sus propágulos infectivos, estarían ligadas con la fenología de las plantas ruderales y pioneras en ecosistemas secundarios como huéspedes temporales hasta el establecimiento a largo plazo de especies leñosas y anuales (Guadarrama *et al*., 2007). Al contrario, la menor densidad de esporas en las zonas agrícolas y multipropósito, se relacionan directamente al manejo agrícola y los parámetros fisicoquímicos del suelo analizados previamente, señalan que valores altos de Fe, P y porcentajes elevados de materia orgánica, indican condiciones no óptimas para desarrollar los mecanismos de acción requeridos entre el hongo-planta, al no generar un estrés en la planta y servir como amortiguador de condiciones desfavorables de las plantas. Concordante con autores como Covacevich *et al*. (2012) y Thougnon-Islas *et al*. (2014), al indicar que la multiplicación de HMA se ve reducida en zonas agrícolas por la aplicación de fertilización química, influyendo en las concentraciones altas de P y Fe. Del mismo modo, concentraciones altas de Cu y Mn influyen en la el establecimiento de la simbiosis, según lo reportado por Sensoy *et al*. (2013).

Propagación micorrízica

Al término del cultivo trampa se contabilizaron en las 75 muestras de suelo rizosférico (10g de suelo por muestra), un total de 4,886 esporas de HMA (Figura 3). Lo que indica un incremento de esporas proporcional al término de la multiplicación desde su inoculación inicial. El número de esporas de los consorcios de HMA nativos mostró diferencias signifitivamente estadísticas entre los tratamientos ($p \leq 0.0001$). Los tratamientos 1 (vegetación secundaria) y T3 (sistema agrícola), presentaron el mayor número de esporas nativas de HMA, al encontrarse 1,120 (74.67 ± 5.56) y 836 (55.73 ± 8.32) esporas en las 15 unidades experimentales. Con respecto al incremento de esporas nativas de HMA, en el tratamiento T1 se registró un incremento del 50.71 %. No obstante, en el tratamiento T2 (multipropósito) y T3 se presentaron los mayores incrementos con el 53.22 y 67.34 %, respectivamente. Por otra parte, el grupo control positivo, presentó el mayor número de esporas de HMA cuantificadas en el estudio 2,028 (135.20 ± 26.24) esporas de HMA. No obstante, solo presentó un incremento del 26.03 % (Figura 3). Lo que implica, que el inoculante conformado de consorcios HMA nativos presentó el mayor incremento (>50 %) en comparación a la formulación comercial. Por otro lado, el CN (Sin inoculación), presentó un número de 74 esporas de HMA. Lo que señala la presencia de contaminación durante la etapa de semillero o bajos resultados de desifección por parte del método de oxidación por H_2O_2 al 2.24 % (Cuervo-Usán *et al*., 2014), empleado para la esterilización del sustrato sólido del cultivo trampa.

Referente a la propagación de HMA empleando a *Cucurbita pepo* L var. "Grey Zucchini" como modelo de multiplicación de esporas, los resultados que se presentan en este estudio son similares en cantidad de esporas reportadas en otros cultivos trampa empleando especies agrícolas alternativas (hortalizas, frutales y ornamentales) para el trampeo de HMA. Salas y Blanco (2000), registraron en hortalizas *Capsicum annum*, *Cucumis sativus*, *Allium porrum*, una densidad de esporas mayor a 1000 esporas en 100 g de suelo. Asimismo, en especies ornamentales como en *Begonia* sp., var. Rex, se reportó una producción de entre 20-50 esporas en 50 g de suelo (Morales-Alvero *et al*., 2011) y *Tajetes erecta*, 679 esporas en 100 g de suelo (Usanga-Osorio *et al*., 2008). Para Leguminosas, se reportó un total de 170.60 y 400 esporas de HMA multiplicadas en cultivos trampas de *Phaseolus vulgaris* (Aguilar-Ulloa *et al*., 2016) y *Pisum sativum* (Esquivel-Quispe, 2020). No obstante, la mayor productividad en la producción de esporas de HMA en sustrato se ha registrado en especies con alto potencial micotrófico, un ciclo de vida corto, manejo moderado y adaptabilidad a condiciones edafoclimáticas adversas, consideradas condiciones ideoneas para la producción de esporas de HMA (Cuenca *et al*. 2003; Yao *et al*., 2010; Trejo-Aguilar *et al*., 2013). En *Trifolium repens*, *Zea mays* y *Sorghum bicolar* se ha reportado 1,061, 3,936 y 2,323 esporas de HMA por kg de suelo (Yao *et al*., 2010). Ademas, Carrenho *et al*. (2002), registró 4,152 y 3,498 esporas de HMA por kg de suelo en cultivos trampa de *Zea mays* y *Sorghum bicolar*.

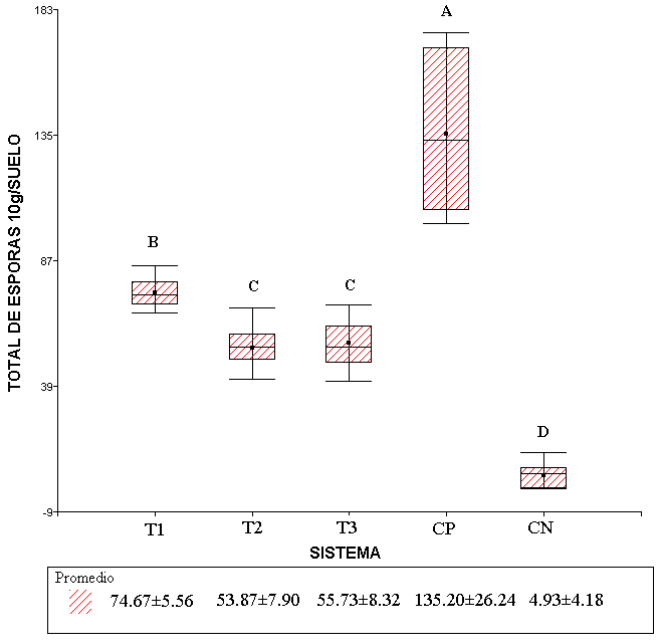


Figura 3. Número de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en 10 g de suelo propagadas por tratamiento en el estudio. T1 = Vegetación secundaria; T2 = Sistema multipropósito; T3 = Sistema agrícola; CP = Producto comercial inoculante de micorrizas arbusculares; CN = Sin inoculante micorrizico. Medias ± D.E.; Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Number of spores of arbuscular mycorrhizal fungi in 10 g of soil propagated per treatment in the study. T1 = Secondary vegetation; T2 = Multipurpose system; T3 = Agricultural system; CP = Commercial inoculant product for arbuscular mycorrhizae; CN = Without mycorrhizal inoculant. Means ± SD; Means with a letter in common are not statistically different ($p \leq 0.05$).

Composición de HMA por morfotipo

Durante la fase de multiplicación de HMA, la estructura del inóculo micorrizico nativo se agrupó en morfotipos con características similares a las familias Glomaceae y Gigasporaceae. El morfotipo Glomaceae (M1) representó el 94.97 % de la incidencia de HMA en el estudio, seguido de Gigasporaceae (M2) con el 5.03 %. Al contrario, el CP positivo (Glumix®), presentó el 100% de incidencia del morfotipo Glomaceae (M1) (Tabla 4), dado que, su formulación estuvo conformada de cepas de morfoespecies de interés comercial pertenecientes al género *Glomus*. En términos generales, por morfotipo, Glomaceae (M1) fue considerado el más representativo en el estudio. Autores como Esquivel-Quispe *et al*. (2021), menciona al morfotipo Glomaceae, como el principal agente biológico presente en formulaciones comerciales y nativas de HMA en los diferentes estudios recabados sobre infectividad y propagación de hongos micorricícos arbusculares. La mayor incidencia de HMA pertenecientes a la familia Glomaceae, se relaciona directamente a su mayor distribución en una gran diversidad de ecosistemas naturales. Incluido ecosistemas perturbados por diferentes actividades antropogénicas (Brundrett y Tedersoo, 2018). Relacionados a una tasa de esporulación mayor contraria a otras familias y la plásticidad biológica propia de sus propagúlos fúngicos que condiconan una mayor prevalencia en el suelo. En contraste, a una menor tasa de esporulación y prevalencia, influenciada principalmente por la estructura vegetal de un ecosistema, las esporas de la familia Gigaspoaraceae (M2), representa el morofotipo con menor incidencia en el estudio, dado que las esporas de Gigaspoaraceae, requieren de una estructura vegetal ya establecida, principalmente de especies leñosas para su prevalencia (Guadarama *et al*., 2007). Del mismo modo, la estructura micelial de cada morfotipo, puede determinar su prevalencia. Glomaceae presenta una capacidad mayor de extensión de su red micelial. Por lo que le brinda mayor probabilidad de establecimiento (Voets *et al*., 2006). Contrariamente, Gigasporaceae, está compuesta de hifas gruesas y cortas que limitan su extensión (de la Providencia *et al*., 2005).

Tabla 4. Composición de morfotipo de hongos micorrízicos arbusculares por tratamientos del estudio.
Table 4. Arbuscular mycorrhizal fungi morphotype composition by study treatment.

ID	Glomaceae	Gigasporaceae
T1	68.13±6.32 c	6.53±2.97 a
T2	49.20±7.47 c	4.67±3.31 a
T3	51.47±8.34 c	4.07±2.96 a
CP	137.00±26.17 a	0.53±0.74 b
CN	4.60±3.76 d	0.33±0.62 b

T1 = Vegetación secundaria; T2 = Sistema multipropósito; T3 = Sistema agrícola; CP = Producto comercial inoculante de micorrizas arbusculares; CN =Sin inoculante micorrizico. Medias ± D.E.; Medias con una letra en común no son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).
T1 = Secondary vegetation; T2 = Multipurpose system; T3 = Agricultural system; CP = Commercial inoculant product for arbuscular mycorrhizae; CN = Without mycorrhizal inoculant. Means ± SD; Means with a letter in common are not statistically different ($p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

La calabacita, *Cucurbita pepo* L., var. "Grey Zucchini", presenta una afinidad micotrófica con la interacción de hongos micorrizogénos arbusculares y puede ser tomada en cuenta como un modelo adecuado para implementar el trampeo y multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares. Asimismo, los inóculos de HMA nativos presentan mayor afinidad e incremento en comparación a la formulación comercial empleada en el estudio. Lo que infiere que el usó de inóculos de HMA nativos permitirá obtener un recurso bioologico con mejor adaptación a las variaciones en composición de los sustratos y condiciones edafoclimáticas de la región.

REFERENCIAS

Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., y Torres-Cruz, T.J. 2016. Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. Revista Tecnología en Marcha, 29: 5-14.

Alvarado-Carrillo, M., Díaz-Franco, A., y Alejandro-Allende, F. 2018. Gallinaza, micorriza arbuscular y fertilización química reducida en la productividad de calabacita y pepino. Revista internacional de contaminación ambiental, 34(2): 273-279.

Barriga, J., Visbal, M., y Acero, J. 2011. Relación entre los caracteres de las micorrizas arbusculares nativas con las propiedades físico-químicas. Revista Científica UDO Agrícola, 11(1): 134-141.

Bautista, F. 2021. Clasificación de suelos de la península de Yucatán. En: Los territorios kársticos de la península de Yucatán: caracterización, manejo y riesgos. Bautista F (Coord.) Asociación Mexicana de Estudios sobre el Karst. pp. 25-38. Ciudad de México, México.

Bautista, F., Palacio, J.L., y Delfín, H. 2011. Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. Cap. II. Ambiente. Suelos. En: Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. F. Bautista y J. L. Palacio. (ed.), pp 227-259. Segunda edición. Universidad Autónoma de México. D.F., México.

Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., y Bianciotto, V. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. Frontiers in microbiology, 6, 1559.

Borges-Gómez, L., Moo-Kauil, C., Ruíz-Novelo, J., Osalde-Balam, M., González-Valencia, C., Yam-Chimal, C., y Can-Puc, F. 2014. Suelos destinados a la producción de chile habanero en Yucatán: características físicas y químicas predominantes. Agrociencia, 48(4):347-359.

Carrenho, R., Trufem, S.F., y Bononi, V.L. 2002. Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agroecosystem. Brazilian Journal of Botany, 25: 93-101.

Covacevich, F., Eyherabide, M., Sainz Rozas, H., y Echeverría, H.E. 2012. Características químicas determinan la capacidad micotrófica arbuscular de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). Ciencia del suelo, 30(2):119-128.

Cuenca, G., De Andrade, Z., Lovera, M., Fajardo, L., Meneses, E., Márquez, M., y Machuca, R. 2003. Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. Ecotrópicos, 16(1):27-40.

Cuervo-Usán, Y., Tornos-Mauri, P., Hernández-Domínguez, J.C., Orihuela-Calvo, D., Domínguez-Hernández, M.E., y Moreno-

Martínez, E. 2014. Eficacia de peróxidos en la desinfección de suelos aptos para el cultivo de fresa en el Mediterráneo. Revista fitotecnia mexicana, 37(4):393-398.

Cruz, Y., García, M., León, Y. y Acosta, Y. 2014. Influencia de la aplicación de micorrizas arbusculares y la reducción del fertilizante mineral en plántulas de tabaco. Cultivos Tropicales, 35(01): 21-24.

De La Providencia, I.E., De Souza, F.A., Fernández, F., Delmas, N.S., y Declerck, S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenic groups. New Phytologist, 165(1):261-271.

Díaz-Franco, A., Alvarado-Carrillo, M., Alejandro-Allende, F., y Ortiz-Cháirez, F.E. 2016. Crecimiento, nutrición y rendimiento de calabacita con fertilización biológica y mineral. Revista internacional de contaminación ambiental, 32(4): 445-453.

Durán-García, R., Méndez-González, M., y Larqué-Saavedra, A. 2016. The biodiversity of the Yucatan Peninsula: a natural laboratory. In: Cánovas, F., Lüttge, U., Matyssek, R. (eds) Progress in Botany Vol. 78. Progress in Botany, vol 78. Springer, Cham.

Eguiarte, L.E., Hernández-Rosales, H.S., Barrera-Redondo, J., Castellanos-Morales, G., Paredes-Torres, L.M., Sánchez-de la Vega, G., Ruiz-Mondragón, K.Y., Vázquez-Lobo, A., Montes-Hernández, S., Aguirre-Planter, E., Souza, V., y Lira, R. 2018. Domestication, diversity, genetic and genomic resources of Mexico: The case of pumpkins. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21 (Supl. 2): 85-101.

Esquivel-Quispe, R., Quispe-Ochoa, J.O., y Hernández-Cuevas, L.V. 2021. Experiencias sobre la propagación y efectividad de los hongos micorrizógenos arbusculares en Latinoamérica. Journal of the Selva Andina Biosphere, 9(2):99-110.

FAO. 2017. El Estado de la Seguridad Alimentaria y la Nutrición en el Mundo 2017. Fomentando la Resiliencia en Aras de la Paz y la Seguridad Alimentaria. FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. Roma, Italia.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2022. Superficie, producción y rendimiento de calabazas en el mundo.

Gerdemann, J.W. y Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species ex-tracted from soil by wet sieving and decanting'. Transactions of the British Mycological Society, 46: 235-244.

Guadarrama-Chávez, P., Camargo-Ricalde, S.L., Hernández-Cuevas, L., y Castillo-Argüero, S. 2007. Los hongos micorrizógenos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México. Botanical Sciences, (81):131-137.

Habte, M. y Osorio, N.W. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum.

Lehmann, A. y Rillig, M.C. 2015. Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops—A meta-analysis. Soil Biol. Biochem. 81:147-158.

Montenegro-Gómez, S.P., Barrera-Berdugo, S.E., y Valencia, C.M. 2017. Bioprospección de hongos micorrízicos arbusculares como alternativa para el fortalecimiento del cultivo de aguacate (*Persea americana* Miller) en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 8(1): 71-79.

Gutiérrez J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M. y Hernández-Ávila, M. 2012 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

IUSS. Working Group WRB. 2015. World reference base for soil resources. In International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps, 2015th ed.; World Soil Resources Reports No. 106; World

Morales-Alvero, C., Calaña Naranjo, J.M., Corbera Gorotiza, J., y Rivera Espinosa, R. 2011. Evaluación de sustratos y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares en *Begonia* sp. Cultivos Tropicales, 32(1):50-62.

NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación desuelos, estudios, muestreo y análisis.

OMS. 2017. Metas mundiales de nutrición 2025: documento normativo sobre retraso del crecimiento, Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.

Ramírez-Jaspeado, R., Palacios-Rojas, N., Nutti, M., y Pérez, S. 2020. Estados potenciales en México para la producción y consumo de frijol biofortificado con hierro y zinc. Revista fitotecnia mexicana, 43(1):11-23.

Ramos-Zapata, J., Marrufo-Zapata, D., Guadarrama-Chávez, P., Solís-Rodríguez, U., y Salinas-Peba, L. 2013. Ruderal plants: temporary hosts of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agricultural systems. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 16(3):399-406.

Salas, E. y Blanco, F. 2000. Selección de plantas hospederas y efecto del fósforo para la producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas. Agron. Costarricense. 24:19-28.

Sensoy, S., Ocak, E., Demir, S., y Tufenkci, S. 2013. Effects of humic acid, whey and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) applications on seedling growth and Fusarium wilt in zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Journal of Animal and Plant Sciences, 23(2):507-513.

SIAP (2022) Acciones y programas. Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México, México.

Sieverding, E. 1990. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment. 29(1-4): 369-390.

Thougnon-Islas, A.J., Eyherabide, M., Echeverría, H.E., Sainz Rozas, H.R., y Covacevich, F. 2014. Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. Revista argentina de microbiología, 46(2):133-143.

Trejo-Aguilar, D., Lara-Capistrán, L., Maldonado-Mendoza, I.E., Zulueta-Rodríguez, R., Sangabriel-Conde, W., Mancera-López, M.E., Negrete-Yankelevih, S. y Barois, I. 2013. Loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in trap cultures during long-term subculturing. IMA fungus, 4(2):161-167.

Usuga Osorio, C.E., Castañeda Sánchez, D.A., y Franco Molano, A.E. 2008. Multiplication of arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) and mycorrhization effect in micropropagated plants of banana (Musa AAA cv.'Gran Enano (Musaceae). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 61(1):4279-4290.

Upadhayay, V.K., Singh, A.V., Khan, A., y Sharma, A. 2022. Contemplating the role of zinc-solubilizing bacteria in crop biofortification: An approach for sustainable bioeconomy. Front. Agron. 4:903321.

Voets, L., De La Providencia, I.E., y Declerck, S. 2006. Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. New Phytologist, 172(2):185-188.

Wan Shafiin, W.N.S., Ablah, N.L., Nur Fatihah, N.H., Alam, A., Ma'Arup, R., Jahan, M.S., Mustafa, K.A. y Alias, N. 2020. Breeding strategies for enhancing nutrient content and quality in Cucurbitaceae: a review. International Journal of Vegetable Science, 1-24.

Yao, Q., Gao, J.L., Zhu, H.H., Long, L.K., Xing, Q.X., y Chen, J.Z. 2010. Evaluation of the potential of trap plants to detect arbuscular mycorrhizal fungi using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Soil Science & Plant Nutrition, 56(2):205-211.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Estudio de los cambios químicos en microensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) durante la fermentación en medio sólido

Study of chemical changes in shrimp (*Litopeneus vanamei*) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) exoskeletons microsilages during fermentation in solid medium

Adolfo Amador Mendoza[1]*✉, Humberto Rafael Bravo Delgado[2]✉, Ana Rosa Ramírez Seañez[1] y Hipólito Hernández Hernández[1]

[1] Instituto de Agroingeniería, Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita. C.P. 68400. Av. Ferro-carril s/n, CD. Universitaria, Loma Bonita, Oax., México.

[2] Universidad Tecnológica de Tehuacán. C.P. 75859. Prolongación de 1 sur 1101, San Pablo Tepetzingo, Tehuacán, Puebla, México.

RESUMEN

La fermentación en medio sólido es una técnica utilizada para la producción de quitina, pigmentos, proteínas y lípidos. En el presente trabajo se evaluaron los cambios en la composición química y microbiológica en micro ensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) fermentados con un inoculo comercial de *Lactobacillus plantarum* AVG-112. Se determinó la cantidad de melaza para la fermentación, la composición proximal y la cuenta microbiológica de los ensilados. Los desechos se mezclaron con melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y se inoculó usando una cepa comercial (*Lactobacillus plantarum* AVG-112). A los 5 d de fermentación ambos ensilados presentaron características físicas y químicas aceptables. Los coliformes totales, mohos y levaduras no estuvieron presentes siendo inhibidos por el proceso de ensilaje. Concluimos que la fermentación en medio sólido tiene características adecuadas para su utilización como suplemento en alimentos para organismos acuáticos.

Palabras clave: Fermentación en medio sólido; exoesqueleto; camarón; chapulín.

ABSTRACT

Fermentation in a solid medium is a technique used for the production of chitin, pigments, proteins and lipids. In the present work, changes in the chemical and microbiological composition were evaluated in micro silages of shrimp (*Litopeneus vanamei*) and grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) exoskeletons, fermented with a commercial inoculum of *Lactobacillus plantarum* AVG-112. The amount of molasses for fermentation, proximal composition and microbiological count of the silages, were determined. The waste was mixed with sugarcane molasses as a carbon source and inoculated using a commercial strain (*Lactobacillus plantarum* AVG-112). After 5 days of fermentation, both silages presented acceptable physical and chemical characteristics. Total coliforms, molds and yeasts were not present and were inhibited by the ensiling process. We concluded that fermentation in a solid medium has suitable characteristics for use as a food supplement for aquatic organisms.

Keywords: Fermentation in solid medium; shrimp; grasshopper; exoskeletons.

INTRODUCCIÓN

Los desechos de camarón como subproductos, por lo general son considerados basura en México y su incorrecta disposición genera daños ambientales. No obstante, muchos reportes señalan que son una fuente importante de compuestos de interés industrial, entre ellos la quitina y el quitosano, ampliamente estudiados en distintas áreas, incluida la de salud, debido a los efectos benéficos que les confieren. De acuerdo con los datos de la Comisión Nacional de Pesca y Acuacultura (CONAPESCA), durante el periodo 2020-2021 se reportó una captura de 249 mil 958 ton de camarón. Por otro lado, el chapulín (*Sphenarium purpurascens Ch.*), es un alimento habitual en algunas regiones de México. Se trata de saltamontes (*Ortoptera*), que los mexicanos fríen y comen con sal y limón. En Oaxaca se publicitan en los mejores hoteles y restaurantes como una delicia típica de la región. El chapulín tiene un alto contenido de proteínas de acuerdo con lo reportado por Torruco *et al*. (2019); aunque no se considera un desecho, el chapulín tiene una vida de anaquel de 3 a 5 días, y por ello, algunos comerciantes y productores locales se ven en la necesidad de tirarlo. Esto ocasiona el desperdicio de proteína de alta calidad y un aumento de la contaminación ambiental. Dentro de los aprovechamientos más sustentables de estos desechos se encuentra la producción de ensilados de desechos de crustáceos para la elaboración de alimentos para aves, ganado y peces, mediante la fermentación en estado sólido (FES) (Nigam *et al.*, 2000). El objetivo del proceso es el aumento parcial del contenido proteico de los alimentos, mejorando además las posibilidades de conservación, cambiando sus características fisicoquímicas y sensoriales. Los sustratos utilizados deben proporcionar un buen ambiente de crecimiento de la flora microbiana y permitir la síntesis de las diferentes enzimas (Pandey *et al.*, 2003). Dentro de los aspectos más importantes

*Autor para correspondencia: Adolfo Amador Mendoza
e-mail: fito_adamme@hotmail.com
Recibido: Febrero 28 de 2023
Aceptado: Enero 17 de 2024
Publicado: Enero 19 de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1976

para la fermentación en sólido se encuentran: la selección del microorganismo y sustrato adecuado, optimización de parámetros del proceso, aislamiento y purificación del producto. Para la selección del sustrato hay que evaluar si se requiere un sustrato específico o si el objetivo es obtener un producto específico de un sustrato adecuado. Los parámetros del proceso y su optimización son importantes, así como ciertos parámetros fisicoquímicos y bioquímicos tales como: el tamaño de las partículas del sustrato, humedad inicial, pH y pretratamiento del mismo, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, la suplementación de nutrientes, fuente de carbono e inductores, extracción de producto y depuración (Cira, 2000; Pandey *et al*., 2003; Pacheco *et. al*., 2009; Peniche, 2006 y Ramirez *et. al*., 2009). Los ensilados biológicos se basan en la fermentación ácido-láctica y son un excelente producto proteínico de alto valor biológico que se ha empleado para la alimentación animal y se ha elaborado con diversas especies de crustáceos y desechos de peces (Vidotti, 2003). Algunas cepas de bacterias ácido-lácticas son capaces de degradar las aminas biogénicas empleando las amino-oxidasas, lo que reduce la concentración de ellas (Dapkevicius, *et al*., 2000), reduciendo así el crecimiento de hongos, bacterias patógenas y responsables de la putrefacción; así la acidez de la fermentación permite la estabilidad de aminoácidos, como isoleucina, treonina, cistina, metionina y lisina, manteniendo valores similares a los de la harina de pescado (Viddotti *et al*., 2003), por lo que, estos ensilados pueden utilizarse como suplemento en dietas con base en harina de pescado como aporte de proteína para la nutrición acuícola. La fermentación en medio sólido de residuos de crustáceos y una producción de ácido láctico *in situ* por bacterias ácido lácticas inducen la licuefacción del residuo semisólido y se produce una disminución en el pH así como la activación de proteasas que desproteinizan los residuos. Un efecto colateral de la fermentación en medio sólido es la producción de ácido láctico por la fermentación de carbohidratos, que conduce a una desmineralización de los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Xu *et al*., 2008; Gimeno *et al*., 2007). La fermentación del residuo de camarón resulta en un licor rico en proteínas, minerales y carotenoides (especialmente astaxantina), así como una fracción sólida rica en quitina. La fracción líquida puede ser utilizada como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Shirai *et al*., 2001; Cira *et al*., 2002; Bashkar *et al*., 2007). La utilidad de la preservación por medio de fermentación es debida a su naturaleza amigable, ecológicamente comparada con los métodos de preservación que involucran ácidos o bases, o el secado, que son ecológicamente agresivos y económicamente no viables (Bahskar *et al*., 2007). La fermentación del desperdicio para recuperar quitina, reemplaza considerablemente el proceso químico (Bahskar *et al*., 2007); sin embargo, para producir una quitina de calidad estándar, la proteína y minerales residuales de la quitina cruda deben ser removidos mediante tratamientos suaves con álcalis y ácidos (Cira *et al*., 2002; Sini *et al*., 2007). También se ha reportado el uso de proteasas para la desproteinización de caparazones de crustáceos, que evitaría el tratamiento alcalino. Además de la aplicación de exoenzimas, algunas bacterias proteolíticas son usadas para la desproteinización de caparazones desmineralizados (Sini *et al*., 2007; Xu *et al*., 2008). Jung *et al.* (2005) realizaron la fermentación láctica para la desmineralización de los residuos de carapacho del cangrejo rojo utilizando *Lactobacillus paracasei* subesp. tolerans KCTC–3074. Diversas concentraciones de glucosa se adicionaron como una primera fuente de carbono y varias cantidades del cultivo bacteriano se inocularon como cultivo iniciador. Rao *et al.* (2000), determinaron los factores que afectan al *Lactobacillus plantarum* durante la fermentación de los desechos de camarón en la producción de quitina y licor de proteína. El objetivo de la fermentación fue posible por la secreción de proteasas y la reducción del pH, ésta se favoreció agregando ácido cítrico, en sustitución del ácido acético, incrementando con ello hasta un 88% la desproteinización y a 90 % la desmineralización. El propósito del presente trabajo fue determinar los cambios en la composición química y microbiológica de micro ensilados de exoesqueletos de camarón (*Litopeneus vanamei*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*), durante el proceso de fermentación con un inoculo comercial de *Lactobacillus plantarum* AVG-112 como pretratamiento para la obtención de quitina cruda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Para la realización de este proyecto se utilizaron dos fuentes quitinosas, la primera fueron desechos de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) adquiridos en la comunidad de Ocotlán en la ciudad de Oaxaca y la segunda, los desechos de camarón obtenidos en puntos de venta del centro de Tuxtepec, Oaxaca. Ambas muestras se congelaron a - 5 °C, posteriormente se molieron y tamizaron (No. 50) a un tamaño de partícula de 300 µm.

Fuente de Carbono

Se utilizó como fuente de carbono melaza de caña de azúcar (Ingenio Adolfo López Mateos, Tuxtepec, Oaxaca, México) que se adicionó en una proporción de 18 % (p/p) a los substratos quitinosos (Ramírez-Ramírez *et al*., 2009; Amador *et al*., 2022).

Microorganismo

El microorganismo probado para la fermentación fue la cepa ácido láctica comercial *Lactobacillus. plantarum* BG-112 (Raff, S.A. de C.V., grupo italiano Clerici-Sacco). Se realizó una cinética de crecimiento reactivándose en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) incubándose a 38 °C por 2.5 h (Incubadora, marca: Felisa®, modelo: FE-132AD, México). Para la inoculación de cada uno de los desechos se consideró el valor de la velocidad específica de crecimiento (µ), calculada por la ecuación de Monod (Monod, 1949; Han y Levenspiel, 1988):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde μ_{max} es la máxima velocidad de crecimiento específico (0.198 h^{-1}) y K_s es el parámetro de saturación del sustrato (g/l), también definido como la concentración de sustrato a la cual la velocidad μ es igual a la mitad de μ_{max}.

Condiciones de fermentación ácido láctica

Los desechos molidos se mezclaron con 18 % (p/p base húmeda) de melaza, inoculándose posteriormente con 5 % (p/v base húmeda) de medio de cultivo man rogosa sharpe (MRS) con la cepa ácido láctica comercial. Se emplearon frascos de poliuretano de 30 mL con dimensiones de 5.5 cm de alto y 3.0 cm de ancho, llenados siguiendo el criterio geométrico y condiciones de fermentación establecidas por Ramírez-Ramírez (2009) resumidas en la Tabla 1. Por último, se incubaron a 30 °C durante intervalos de tiempo de 24, 48, 74, 96 y 120 h colocándose en una incubadora a 38 ± 1 °C (Cira *et al.*, 2002).

Tabla 1.- Dimensiones y cantidad de carga de los microensilados de camarón y chapulín.
Table 1.- Dimensions and load quantity of shrimp and grasshopper microsilages.

Muestra	Altura de llenado (cm)	Cantidad de mezcla (g)	Volumen ocupado (cm^3)	Densidad aparente (g/cm^3)
Camarón	3.9	3.5	27.56	1.27
Chapulín	3.9	4.0	27.0	1.15

Análisis de las muestras

Evaluación del ensilado

La evaluación física del ensilado se realizó de acuerdo a Bertullo (1989) considerando las condiciones de olor, color y consistencia. Únicamente participaron 5 personas en la evaluación.

Determinación de pH y Acidez Total Titulable (ATT)

La fracción sólida se diluyó al 1 % (p/v) en agua destilada y se colocó en una parrilla con agitación magnética para medir el pH usando un potenciómetro (Orion 920A), inmediatamente después se determinó la acidez total titulable (ATT) con NaOH 0.1 N durante 120 h cada 24 h.

Análisis bromatológico

El contenido de humedad y cenizas, se determinaron empleando los métodos estándar (AOAC, 1990). El nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl para proteína cruda (N x 6.25) y finalmente los carbohidratos se obtuvieron por diferencia. Los cálculos se hicieron en base húmeda y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Análisis microbiológico

Se estudió la relación entre el crecimiento microbiano con respecto a la acidificación de los microensilados a las 120 h. Para formar diluciones decimales, las muestras fueron homogeneizadas en una solución salina isotónica 0.09 % de NaCl. El crecimiento microbiano fue determinado por conteo en placa de colonias usando medio de agar para métodos estándar, man, rogosa y sharpe (MRS) y agar papa dextrosa (PDA) para: mesófilicos totales, coliformes totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta total de hongos y levaduras, respectivamente (Borrás *et al.*, 2020).

Determinación de la actividad de agua

Para este análisis se utilizó un analizador de humedad denominado Aqualab PAWKIT® (Medidor de Actividad de Agua).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos de la evaluación de pH y porcentaje de ácido láctico durante el proceso de ensilado para las diferentes proporciones de melaza, se les realizó una comparación de medias agrupadas con un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación con la prueba de Tukey para verificar si las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se utilizó el programa MINITAB® Versión 19 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Constitución de la melaza sobre la fermentación

El ensilaje biológico requiere la adición de carbohidratos altamente fermentables para facilitar la acción de las bacterias lácticas, debido a que en el camarón y en el chapulín existen escasas cantidades de estos compuestos (Jay, 2000; Plascencia *et al.* 2002). Entre otras fuentes de carbono, la melaza de caña de azúcar ha sido la más utilizada para este propósito en concentraciones desde 5 hasta 40 % (Zahar *et al.*, 2002). El porcentaje de humedad de la melaza, empleada fue de 23.11 ± 0.01 %, el de las cenizas de 9.51 ± 0.02 %, el de proteínas de 4.25 ± 0.02 %, el pH 5.43 ± 0.01 y la actividad de agua (aw) de 0.67 ± 0.01. La concentración de la fuente de carbono fue de 18 % (p/p) para la fermentación de la mezcla de exoesqueletos de camarón y chapulín. Como iniciador se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* ABG- 112 y las muestras sin inóculo fueron usadas como control. La fermentación fue realizada en microsilos tipo frasco durante 120 h, considerando el valor de la velocidad específica de crecimiento para la fase exponencial (μ_{max}) = 0.198 h^{-1} como se muestra en la Figura 1.

Dimensiones y cantidad de carga de los microsilos

Las fermentaciones fueron realizadas en microsilos tipo frasco durante 120 h con las dimensiones geométricas que se muestran en la Tabla 1.

Caracterización física de los ensilados

En la Tabla 2 y 3, se presentan las características físicas del ensilado durante cinco días de fermentación, donde se observa que el color de los microensilados de camarón fue más claro (marrón claro) que los ensilados del chapulín, que fueron más oscuros (marrón oscuro), esto debido al color natural de la especie, teniendo en cuenta las proporciones de melaza. El olor indicó en ambos ensilados que son ácidos y ligeramente

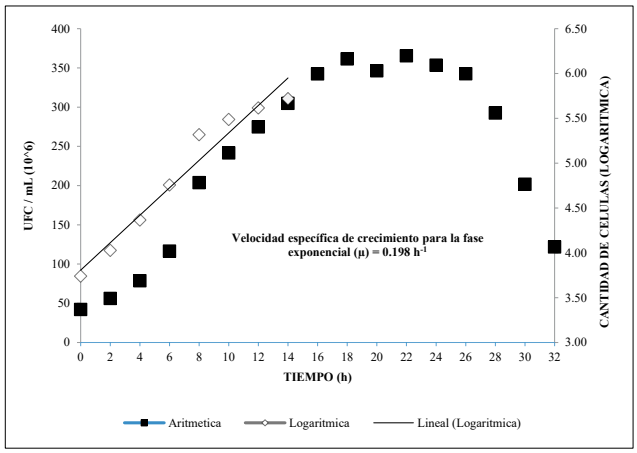


Figura 1.- Gráfica semilogarítmica de la concentración (UFC) de *L. Plantarum* AVG-112 en medio man rogosa sharpe (MRS) incubándose a 38 °C por 2.5 h.
Figure 1.- Semilog graph of *L. plantarum* AVG-112 concentration (CFU) in man rogosa sharpe medium (MRS) incubating at 38 °C for 2.5 h.

Tabla 2.- Evaluación física de la calidad de los ensilados propuesta por Bertullo (2009), de acuerdo a sus características.
Table 2.- Physical evaluation of silages quality proposed by Bertullo (2009), according to their characteristics.

Atributo	Bueno	Regular	Inaceptable
Olor	*Ácido Suave*	Picante Penetrante	Pútrido Rechazable
Color	Amarronado Grisáceo Claro	Amarronado Claro-Oscuro, Grisáceo	Gris Oscuro Negruzco
Consistencia	Líquido	Líquido Pastoso o Licuado	Pastoso

Tabla 3.- Evaluación sensorial de la calidad de los microensilados biológicos elaborados a partir de desechos de camarón y chapulín.
Table 3.- Sensory evaluation of the quality of biological micro-silage made from shrimp and grasshopper waste.

Ensilado	Olor	Color	Consistencia
Camarón	Dulce-Ácido con suave olor a Camarón	Marrón Claro	Pastosa con poco liquido en la base de la pasta
Chapulín	*Ácido-Ligeramente Picante*	Amarronado Oscuro	Pastosa con poco liquido en la base de la pasta

picantes, similares y agradables, sin ningún indicio de proceso de descomposición lo cual coincide con los resultados de Vidotti *et al.* (2003) que encontró que los ensilados originan productos con características diferentes, atendiendo a la especie utilizada. Otro indicador es la consistencia, la cual fue pastosa en porque a pesar de que se observó presencia de líquido exudado y gas, la cantidad no era suficiente para darles una consistencia pastosa-líquida. Los microensilados presentaron color amarronado grisáceo claro y aroma dulce agradable con débil olor a camarón y chapulín, lo cual fue debido principalmente al efecto enmascarante de la melaza residual. Además, la actividad del inóculo pudo contribuir a la producción de compuestos aromáticos vía actividad proteolítica que mejora las propiedades sensoriales del producto (Terrones y Reyes, 2018). Estas características pueden hacer atractivo el ensilado de pescado producido para ser aplicado en la formulación de dietas para animales.

Composición química proximal

En las Tablas 4 y 5 se presentan los valores de actividad de agua (A_w), pH, % de acidez total titulable (ATT), % de humedad (H), % de cenizas y % de nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) en los microensilados de exoesqueletos de ambos subproductos adicionados con 18 % de melaza (p/p) y 5 % (v/p) de *L. Plantarum* ABG-112. Se encontró que la humedad fue ligeramente menor en los ensilados de camarón a las 24, 48, y 72 h, lo mismo que la concentración de proteínas, en comparación con los microensilados de chapulín. La proteína en el ensilado del camarón es aparentemente menor por el mayor contenido de humedad y las cenizas entre el material crudo y el ensi-

Tabla 4.- Valores de actividad de agua (Aw), pH, % acidez total titulable (ATT), % humedad (H), % cenizas y % nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación en microensilados de exoesqueletos de chapulín.
Table 4.- Water activity (Aw), pH, % total titratable acidity (ATT), % moisture (H), % ashes and % nitrogen (N) values at, different fermentation times in grasshopper exoskeletons micro silages.

Tiempo de fermentación (h)	Aw	pH	%ATT	%H	% Cenizas	% N
0	0.975 ±0.01	4.81 ±0.01	4.77 ±0.01	8.013 ±0.01	21.347 ±0.02	46.708 ±0.01
24	0.975 ±0.01	4.22 ±0.02	4.98 ±0.01	5.725 ±0.01	21.102 ±0.02	45.764 ±0.01
48	0.97 ±0.01	4.21 ±0.01	5.07 ±0.01	3.996 ±0.01	19.989 ±0.01	40.934 ±0.01
74	0.965 ±0.01	4.13 ±0.01	5.22 ±0.01	3.732 ±0.01	19.819 ±0.02	39.983 ±0.01
96	0.965 ±0.02	4.11 ±0.02	6.37 ±0.01	3.452 ±0.02	19.774 ±0.02	38.245 ±0.01
120	0.96 ±0.01	3.96 ±0.01	8.93 ±0.02	3.361 ±0.01	19.657 ±0.01	38.945 ±0.01

Tabla 5.- Valores de actividad de agua (Aw), pH, % acidez total titulable (ATT), % humedad (H), % cenizas y % nitrógeno (N) a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 74, 96 y 120 h) en microensilados de exoesqueletos de camarón.
Table 5.- Water activity (Aw), pH, % total titratable acidity (ATT), % moisture (H), % ashes and % nitrogen (N) values, at different fermentation times (0, 24, 48, 74, 96 and 120 h) in shrimp exoskeletons micro silages.

Tiempo de fermentación (h)	Aw	pH	%ATT	%H	% Cenizas	% N
0	0.975 ±0.02	4.78 ±0.01	4.71 ±0.01	8.061 ±0.01	19.213 ±0.01	45.372 ±0.01
24	0.975 ±0.01	4.56 ±0.01	5.98 ±0.02	5.389 ±0.02	19.112 ±0.02	42.862 ±0.03
48	0.970 ±0.02	4.45 ±0.01	6.07 ±0.01	3.997 ±0.01	18.898 ±0.01	38.769 ±0.01
74	0.970 ±0.01	4.20 ±0.01	7.22 ±0.01	3.468 ±0.03	18.713 ±0.01	37.987 ±0.01
96	0.965 ±0.01	4.19 ±0.01	8.6 ±0.01	3.360 ±0.01	18.594 ±0.03	36.919 ±0.02
120	0.960 ±0.01	3.90 ±0.01	8.99 ±0.01	3.355 ±0.01	18.387 ±0.01	36.306 ±0.01

lado para ambas especies. El contenido de humedad inicial en el tiempo cero del ensilado del camarón y chapulín fue 8.061 ± 0.76 y 8.013 ± 0.77 %, respectivamente; en el ensilado de camarón, fue considerablemente mayor al reportado por Fagbenro *et al*. (1994), quienes obtuvieron valores de humedad de alrededor del 7.0 % y también superior al reportado por León (2003), quien obtuvo 5.62 % de humedad. Por otra parte, se observó que existió una disminución del contenido de nitrógeno en los ensilados de camarón y chapulín de 9.07 y 7.77 %, respectivamente, desde valores de 45.3721 ± 0.46 y 46.7088 ± 0.37 % (0 h) a 36.3061 ± 0.26 y 38.9453 ± 0.34 % (120 h), respectivamente. Por lo tanto, se puede inferir que con la adición de inóculo se presenta una mayor actividad proteolítica en los ensilados de camarón, lo cual puede verse reflejado en un aumento de la digestibilidad de sus proteínas para ser aprovechadas más eficientemente en alimentación animal (Vidotti *et al.*, 2003), Tal desproteinización se atribuye también a las enzimas presentes en el desecho de camarón, las cuales actúan sobre las proteínas, provocando la hidrólisis y dando lugar a la producción de un lixiviado (Shirai *et al*., 1999). En los ensilados el extracto libre de nitrógeno se presentó un valor superior a la materia prima, lo que resulta de agregar melaza a los desechos para el proceso de fermentación (Vidotti *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2009). Una vez transcurridos los 5 días de fermentación, los microensilados de ambas fuentes presentaron una disminución en la producción de ácido láctico y, por lo tanto, un aumento en el pH. Esto se debió muy probablemente a la inhibición que pudieron sufrir las BAL por el aumento en la concentración de oxígeno durante el muestreo anterior, ya que, en la mayoría de los casos, la presencia de oxígeno suprime el desarrollo de las BAL, siendo mucho más eficiente el uso de oxígeno por microorganismos con una cadena respiratoria funcional para la producción de energía. Estos resultados fueron satisfactorios y permitieron demostrar la posibilidad de obtener un producto estable a tiempos cortos. La actividad de agua disminuyó considerablemente durante el proceso, de 0.975 al inicio hasta valores de 0.96 a los 5 d de fermentación para los dos microensilados, sin haber existido diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). Sin embargo, según lo establecen Madigan *et al.* (2003), en todos los ensilados los valores de A_w fueron importantes para la supervivencia de las BAL y la inhibición de microorganismos dañinos, lo cual permitió mantener estable el producto.

Análisis Microbiológico

Los valores microbiológicos de los ensilados a las 120 h se presentan en la Tabla 6. El ensilado de camarón presentó valores de 132×10^6 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias incubadas 48 ± 2 h y el ensilado de chapulín de 230×10^6 UFC/g. En la determinación de coliformes totales en placa, ambos ensilados mostraron ausencia, quedando dentro del límite máximo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-027-SSA1) (400 UFC/g). También se observó ausencia de mohos y *Salmonella sp*, esto sugiere que los microorganismos patógenos son inhibidos por el proceso de ensilaje. Por otra parte, se considera que la disminución en el valor de pH y la alta acidez favorece el desarrollo de los microorganismos ácido lácticos en los ensilados lo que se puede constatar por la disminución general de los coliformes y la ausencia de *Salmonella* al final del tiempo de fermentación; la incorporación de sorbato de potasio es necesaria previniendo la contaminación del producto fermentado por levaduras que asimilan el ácido láctico.

Tabla 6.- Resultados de los análisis microbiológicos en los ensilados biológicos de los exoesqueletos de camarón y chapulín.
Table 6.- Results of the microbiological analyzes in the biological silages of shrimp and grasshopper exoskeletons.

Muestras	Aerobias Mesófilas (UFC/g)	Coliformes Totales (UFC /g)	Mohos y Levaduras (UFC /g)	*Salmonella* sp (UFC /g)
Camarón	132×10^6	Ausente	Ausente	Ausente
Chapulín	230×10^6	Ausente	Ausente	Ausente

CONCLUSIONES

Se demostró la posibilidad de reutilizar las dos fuentes de exoesqueletos para producir ensilados por fermentación en medio sólido. Este tratamiento biológico influyó en la desproteinización y desmineralización de ambas fuentes. El camarón fue el sustrato que mejor se desproteinizó y desmineralizó en comparación con el chapulín. Los resultados obtenidos demuestran la importancia de los desechos de crustáceos, que pueden ser transformados mediante fermentación ácido láctica en ensilados, adquiriendo alto valor agregado y minimizando los problemas de impacto ambiental y pueden utilizarse como suplemento parcial de la harina de pescado en dietas prácticas en general. Las condiciones microbiológicas de los ensilados indican que la fermentación de estos desechos es inocua y puedan emplearse como insumos en dietas para para alimentación animal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Papaloapan (UNPA) y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento del proyecto.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaramos no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

Amador, M. A., Juárez, J. M., Hernández, H., Ramírez, L. P., Huerta, S., Herman, E. y Rodríguez, M. J. 2022. Evaluación de procesos combinados: purificación de quitina a partir de exoesqueletos de camarón (*Penaeus* sp) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 102: 1-12.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

Bashkar, N., Suresh, P., Sakhare, P., Sachindra, N. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by

response surface methodology and effect of optimized conditions o deproteination/demineralization and carotenoid recovery, Enzyme and Microbial Technology, 40, 1427-1434.

Bertullo, V. 2009. Proyecto de fabricación industrial de ensilado biológico de pescado en Uruguay. Informe de pesca No. 538. FAO. 90 p.

Borrás, L. M., Valiño. E. C., Elías, A., Martínez, J. J., Sanabria, A. M. y Becerra, Mónica. L. 2020. Fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano. Cuban Journal of Agricultural Science, 54 (4): 525-533.

Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M. y Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry. 37:1359-1366.

Cira L. 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.

Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2020. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Edición 2020. México. 21 pp.

Dapkevicius, L. N. E., Nout, J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H. y Wymenga, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 57: 107-114.

Fagbenro, O., Jauncey, K. y Haylor, G. 1994. Nutritive value of diets containing dried lactic acid fermented fish silage and soybean meal for juvenile *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. Aquatic Living Resource. 7: 79-85.

Gimeno, M., Ramírez, J., Martínez, C., Pacheco, N., García, R., Barzana, E. y Shirai, K. 2007. One-Solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 10345-10350.

Jay, J.M. 2000. Modern food microbiology. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.

Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y. y Park R. D. 2006. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans KCTC-3074 and Serratia marcescens FS-3. Applied Microbiology and Biotechnology, 71:234-237.

León, F.J. 2003. Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería. MS Tesis. Universidad de Puerto Rico. RUM. 63pp.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2003. Brock, Biología de los microorganismos, 10ª edición, Madrid, Pearson-Prentice Hall.

Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D. y Marchant, R. 2000. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. Bioresour. Technol. 72:219-226.

Pacheco, N., Garnica, M., Ramírez, J.Y., Flores, B., Gimeno, M., Bárzana E., Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria, Bioresource Technology 100, 2849-2854.

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 13: 81-84. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3

Peniche, C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosana. Universidad de la Habana. Facultad de Química - Cuba.

Plascencia, J. M., Olvera, M. A., Arredondo, J. L., Hall, G. M. y Shirai, K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) diets. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 753-759.

Ramirez C.L., Espinosa M.J., Peter M.G y Shirai K. 2010. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. Bioresource Technology. 101: 9236-9240.

Ramírez, C.L., Marín, M.C., Huerta, S., Revah, S. y Shirai, K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. Process Biochemistry. 41: 1106-1110.

Ramírez Ramírez, J. C. 2009. Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado.

Rao, M. S. y Stevens, W. F. 2005. Chitin production by Lactobacillus fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80: 1080-1087.

Rao, M.S., Muñoz, J. y Stevens, W.F. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. Appl. Microbiol. Biotech., 54: 808-813

Shirai K, 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina. Proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa - México.

Sini, T.K., Santhosh, S. y Mathew, P.T. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using Bacillus subtilis fermentation. Carbohydrate Research 342, 2423-2429.

Terrones, E. E. y Reyes, A. W. 2018. Efecto de dietas con ensilado biológico de residuos de molusco en el crecimiento del camarón *Cryphiops caementarius* y tilapia *Oreochromis niloticus* en co-cultivo intensivo. Scientia Agropecuaria. (2): 167-176.

Torruco, J.G., Hernández, S. B., Herman, L. E., Martínez, S. C., Juarez, B. J.y Rodriguez. 2019. Chemical, functional and thermal characterization, and fatty acid profile of the edible grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.). Eur Food Res Technol. 245: 285-292.

Vidotti, R. M., Carneiro, D., Macedo, V. E. y Carneiro, D. J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. Animal Feed Science and Technology. 105, 199-204.

Xu, Y., Gallert, C. y Winter J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. Applied Microbiology and Biotechnology 79, 687-697.

Zahar M., Benkerroum, N., Guerouali, A., Laraki, Y. y Yakoubi, K. 2002. Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. Bioresour Technol. 82(2):171-176.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Efecto de la intensidad de radiación solar del sistema de pastoreo en la conducta de ovinos Pelibuey en el periodo lluvioso

Effect of solar radiation intensity of the grazing system on Pelibuey sheep behavior in rainy season

Jorge Martínez Melo[1]*✉, Jorge Orlay Serrano Torres[1]✉, Abel González Morales[1]✉, Norge Fonseca Fuentes[2]✉, José Carlos Lorenzo Feijó[3]✉ y Magaly Herrera Villafranca[4]✉

[1] Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez (UNICA), Carretera a Morón km 9 ½ CP: 69450, Ciego de Ávila, Cuba.
[2] Centro de Estudio de Producción Animal (CEPA), Universidad de Granma (UDG), carretera de Manzanillo km 17 ½ CP: 85100, Granma, Cuba.
[3] Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Centro de Bioplanta. Laboratorio de mejoramiento y conservación de recursos fitogenéticos., Ciego de Ávila, 69450, Cuba.
[4] Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

El objetivo fue determinar el efecto de la intensidad de radiación solar del sistema de pastoreo en la conducta de ovinos. El tratamiento 1 consistió en: monocultivo de gramíneas naturales (47 ± 5 lux); el 2: gramíneas naturales con árboles de *Leucaena leucocephala* (34 ± 3 lux); y el 3: gramíneas naturales con árboles de *Manguifera indica* (16 ± 3 lux). Se determinó el tiempo total de cada actividad por sesión del día. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 3x2 (tres intensidades de radiación solar por dos sesiones del día). La conducta en pastoreo fue afectada por la interacción entre los factores. La actividad pastar-caminar fue mayor en los pastoreos de menor nivel de radiación solar (*Leucaena* y *Manguifera*) con 217.50 y 216.38 min respectivamente, en la sesión de la mañana; mientras que todos los tiempos fueron menores en la sesión tarde, con el menor resultado en el pastoreo al sol (108.05 minutos). La reducción de la radiación solar bajo la copa de los árboles favoreció el comportamiento conductual de las ovejas, esto permitió que los animales realizaran actividades de descanso y rumia bajo la sombra de los árboles, con más preferencia en la sesión tarde.

Palabras clave: árboles, bienestar animal, sistema silvopastoril, sombra.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the effect of solar radiation intensity of the grazing system on sheep behavior. Treatment 1, consisted of monoculture of natural grasses (47 ± 5 lux), treatment 2 of natural grasses with *Leucaena leucocephala* trees (34 ± 3 lux) and treatment 3 of natural grasses with *Manguifera indica* trees (16 ± 3 lux). The total time of each activity per daily session was determined. A completely randomized design was used with a 3x2 factorial arrangement (three intensities of solar radiation, two sessions per day). Grazing behavior was affected by the interaction between factors. The grazing-walking activity was higher in the pastures with lower levels of solar radiation (*Leucaena* y *Manguifera*), with 217.50 y 216.38 min, respectively, in the morning session, while all times were lower in the afternoon session, with the lowest result in grazing in the sun (108.05 minutes). The reduction of solar radiation under the treetops favored the behavior of the sheep, which allowed the animals to perform resting and ruminating activities under the shade of the trees, more preferably in the afternoon session.

Keywords: trees, animal welfare, silvopastoral system, shade.

INTRODUCCIÓN

La crianza de ovinos es una actividad común en las zonas rurales por las características que presentan estos animales: la adaptación tanto a climas fríos como cálidos, consumo de alimentos fibrosos y por ser gregarios en su conducta (Hinch, 2017). De igual forma, realizan el pastoreo recorriendo grandes distancias para completar el consumo de pastos (Doughty *et al*., 2016) y presentan mecanismos de termorregulación que les facilitan soportar veranos cálidos en condiciones áridas (Macías-Cruz *et al*., 2016).

Los sistemas que se utilizan para la explotación de la especie ovina en Cuba, en general son extensivos, a base de gramíneas naturalizadas de menor valor nutritivo que producen bajos rendimientos productivos en los animales (Herrera *et al*., 2010). En la provincia Ciego de Ávila la producción ovina se desarrolla como una alternativa para sostener el autoconsumo cárnico y la economía familiar (Borroto *et al*., 2011; Borroto *et al*., 2019), además predominan los sistemas de pastoreo de baja intensidad, con o sin el suministro de forrajes en corrales.

Los sistemas de producción de ovinos de esta región requieren la introducción de tecnologías sostenibles que incrementen la producción y permitan que los animales permanezcan en condiciones ambientales favorables. Tradicionalmente en estos sistemas los animales realizan un pastoreo continuo al sol en las horas más calurosas del día en monocultivos de gramíneas con o sin sombra, cuando presentan algún tipo de árboles, tanto en el área de pasto-

*Autor para correspondencia: Jorge Martínez Melo
e-mail: martinezmelo79@gmail.com
Recibido: 23 de marzo de 2023
Aceptado: 7 de enero de 2024
Publicado: 19 de febrero de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2004

reo como en cercas vivas. Algunos autores plantean que el uso de los árboles contribuye al bienestar de los rumiantes en pastoreo por la reducción de la radiación solar directa (López-Vigoa *et al*., 2017).

Lograr reducir los niveles de radiación solar en áreas de pastoreo es de gran utilidad en climas tropicales con altas temperaturas y humedades relativas, como es característico del periodo lluvioso, desde mayo a octubre, donde ocurre entre el 70 y 80 % de las precipitaciones anuales en Cuba. Por otra parte, otros autores se refieren a los beneficios ambientales y productivos que presentan los sistemas silvopastoriles, por el microambiente que generan los árboles, con menores temperaturas y alta humedad relativa a lo largo del día, así como proporcionar una mejor variedad y calidad en la ración de los ovinos, con mejor eficiencia del uso de la tierra, comparados con los sistemas a base de monocultivo de gramíneas (Sousa *et al*., 2022).

El estudio de la conducta es un método de investigación que se utiliza para evaluar el comportamiento de los animales ante diferentes situaciones, tipos de alimentos, sistemas de manejo y efectos adversos del clima (Lima *et al*., 2014; De *et al*., 2017; Solórzano-Montilla *et al*., 2018). En tal sentido, Hinch (2017) plantea que en los sistemas pastoriles los ovinos son capaces de dedicar gran proporción del tiempo al consumo de los pastos, de acuerdo a la composición y disponibilidad de estos. De igual forma, los rasgos de la conducta pueden mostrar el grado de bienestar de los ovinos en ambientes con altas temperaturas (De *et al*., 2017). Se tuvo en cuenta la poca información existente de estudios de los sistemas de producción de ovinos con la presencia de árboles de regeneración natural como la *Leucaena leucocephala* y *Manguifera indica*, y su efecto en la conducta en pastoreo en el periodo lluvioso. En Cuba, este último se caracteriza por la ocurrencia del 80 % de las precipitaciones anuales y mayor radiación solar, comparado con el periodo poco lluvioso (CMP, 2020). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la intensidad de radiación solar en el sistema de pastoreo sobre la conducta de ovinos Pelibuey, en el periodo lluvioso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en los meses que corresponden al periodo lluvioso (mayo a octubre) en una finca de la provincia Ciego de Ávila, Cuba, a 53 msnm, localizada en las coordenadas 21 52´48,6´´ N y 78 41´32,6´´ W, con precipitaciones entre 600-800 mm anuales, temperaturas promedio de 26.5 ºC y humedad relativa media de 67 % (CMP, 2020).

Animales y tratamientos

Para la realización del presente estudio se respetaron las normas de bienestar animal para la especie ovina y se contó con la aprobación del grupo asesor para el bienestar animal del departamento de Sanidad Animal del Ministerio de la Agricultura Provincial de Ciego de Ávila, Cuba (Anon, 2023). Se utilizaron 18 ovinos machos en crecimiento de la raza Pelibuey con un peso entre 15 y 22 kg, que se dividieron en tres tratamientos de seis animales cada uno. En el tratamiento 1 (control) los animales pastorearon en monocultivo de gramíneas naturales expuestas a la radiación solar directa, con 47 ± 5 lux (media ± DE), en el tratamiento 2 las ovejas pastorearon en gramíneas naturales con árboles dispersos de *Leucaena leucocephala* con 34 ± 3 lux, y en el tratamiento 3 las ovejas pastorearon en gramíneas naturales con árboles dispersos de *Manguifera indica*, con 16 ± 3 lux. Los valores de radiación solar se midieron entre las 11:00 y 12:00 horas. En el caso de los tratamientos con árboles, la intensidad de radiación solar se midió debajo de la copa de los árboles a 1 m del tronco. Cada grupo de animales pastoreó por separado en un potrero de 0.66 hectáreas. Solo existe una unidad experimental en cada tratamiento por el motivo de contar con solo un potrero con las características diferentes de cada tratamiento en la investigación.

Los tres potreros presentaron las mismas condiciones de composición botánica de acuerdo con el Método de los Pasos (Corbea y García-Trujillo, 1982), con *Bothriochloa pertusa* y *Dichanthium caricosum* (40 %) y *Paspalum notatum* (40 %), especies arvenses como el espartillo (*Sporobolus indicus)* (10 %) y malvas (*Sida rhombifolia*) (10 %). Un total de 12.1 árboles/ha en el caso de *Leucaena leucocephala* (8 árboles en 0.66 ha) y 4.5 árboles/ha con la especie *Manguifera indica* (3 árboles en 0.66 ha). El ancho de la copa y la altura de las ramas inferiores de los árboles en el periodo lluvioso fueron de 2.5 y 1.7 metros para *Leucaena leucocephala* y en *Manguifera indica* de 6.5 y 1.8 metros, respectivamente. En los tratamientos 2 y 3 el mismo número de ovejas tuvieron la oportunidad de un espacio bajo la copa de los árboles, pues contaron con 26,1 m^2 y 66,0 m^2 de sombra por animal, para los tratamientos 2 y 3, respectivamente.

Manejo de los animales

Los animales pastorearon dos veces al día, por la mañana entre las 8:00 y 12:00 horas, mientras que en la tarde de 14:00 a 18:00 horas, que constituyó el horario de observación. El resto del tiempo permanecieron en los corrales de sombra, donde se ofertó 0.5 kg de materia fresca por animal, de forraje molido de *Pennisetum purpureum*, la sal común y agua se ofrecieron a voluntad. Antes del periodo experimental los animales tuvieron 21 d de adaptación al sistema de pastoreo.

Procedimiento experimental

Las observaciones directas discontínuas del comportamiento etológico de los animales se realizaron en seis días totales en el periodo lluvioso, con una frecuencia cada 15 días en los meses de mayo, junio y julio, por dos observadores previamente entrenados, que se mantuvieron a una distancia de 15 metros de las ovejas. Se registró la cantidad de• animales cada 10 minutos en las actividades: pastar-caminar, otras actividades, rumiar a la sombra, descansar a la sombra, rumiar al sol y descansar al sol. Se incluyeron en otras actividades lamer, rascar, agredir, desplazarse y ramonear.

Se aplicó el método descrito por Petit (1972), para determinar el tiempo (minutos) en las actividades, en cada observación. Para ello se multiplicó el número de animales

en cada actividad por el intervalo de medición (10 minutos) y se dividió por el total de animales en el tratamiento. Luego se sumó el tiempo total (en minutos) de cada actividad en cada sesión de pastoreo (mañana y tarde).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 3x2 (tres intensidades de radiación solar por dos sesiones del día, mañana y tarde). Los valores del tiempo se transformaron según raíz de (x+0.5).

Los datos de la conducta fueron analizados de acuerdo al modelo estadístico.

$Yij = \mu + Gi + Hj + (GH)(ij) + e(ij)$, donde:

Yij = Valor obtenido de la actividad analizada

μ = media general del experimento

Gi = efecto de la intensidad de radiación solar i = 1, 2, 3

Hj = efecto de la sesión del día j = 1, 2

GH(ij) = efecto de la interacción entre la intensidad de radiación solar i y sesión del día j

e(ij)= error aleatorio asociado con las observaciones Yij.

Se utilizó el análisis de correlación entre las actividades de la conducta. Para las diferencias entre medias se aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey con nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico para ciencias sociales (SPSS, por sus siglas en inglés: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 2011) versión 8.

RESULTADOS

En todas las actividades de la conducta se encontró interacción significativa ($p < 0.001$) entre las intensidades de radiación solar del pastoreo y la sesión del día (Tablas 1, 2 y 3). Los mayores tiempos dedicados a la actividad de pastar-caminar fueron en los tratamientos con menor nivel de radiación solar en el pastoreo (*Leucaena* y *Manguifera*) y en la sesión de la mañana (Tabla 1). Por el contrario, todos los tiempos fueron menores en la sesión de tarde, con el menor resultado en el grupo que pastorea al sol, que representó el 45% del tiempo. La proporción de los tiempos que los ovinos dedicaron a pastar-caminar en la sesión de la mañana, en los tratamientos con menor radiación solar (*Leucaena* y *Manguifera*) fueron del 90.6 y 90.2 %, respectivamente, mientras que en la tarde los tiempos a pastar-caminar representaron 45.0, 61.3 y 63.6 %, para los tratamientos al sol, *Leucaena* y

Tabla 1. Efecto del tratamiento y sesión del día en las actividades pastar-caminar y otras.
Table 1. Effect of treatment and daily session on grazing-walking and other activities.

Actividades	Sesión (horas)	Pastoreo			± EE p
		Al sol 47 ± 5 lux	Con *Leucaena* 34 ± 3 lux	Con *Manguifera* 16 ± 3 lux	
Pastar-caminar	Mañana 8:00-12:00	14.13[b] (199.44)	14.76[a] (217.50)	14.72[a] (216.38)	± 0.036 0.000
	Tarde 14:00-18:00	10.41[d] (108.05)	12.15[c] (147.22)	12.37[c] (152.77)	
Otras actividades	Mañana 8:00-12:00	2.15[b] (4.16)	2.72[a] (6.94)	2.08[b] (3.88)	± 0.033 0.000
	Tarde 14:00-18:00	2.27[b] (4.72)	1.47[c] (1.66)	1.71[c] (2.50)	

a, b, c, d Medias con superíndices no comunes difieren significativamente a $p < 0.05$ (Tukey), ( ) Datos originales en minutos.

Tabla 2. Efecto del tratamiento y sesión del día en las actividades a la sombra.
Table 2. Effect of treatment and daily session on activities in the shade.

Actividades	Sesión (horas)	Pastoreo			±EE p
		Al sol 47 ± 5 lux	Con *Leucaena* 34 ± 3 lux	Con *Manguifera* 16 ± 3 lux	
Rumiar a la sombra	Mañana 8:00-12:00	0.70[d] (0.00)	2.08[c] (3.88)	2.15[c] (4.16)	±0.032 0.000
	Tarde 14:00-18:00	0.70[d] (0.00)	6.68[a] (44.16)	6.13[b] (37.22)	
Descansar a la sombra	Mañana 8:00-12:00	0.70[d] (0.00)	2.90[c] (8.05)	3.99[b] (15.83)	±0.070 0.000
	Tarde 14:00-18:00	0.70[d] (0.00)	6.63[a] (43.61)	6.89[a] (47.50)	
Tiempo total a la sombra	Mañana 8:00-12:00	0.70[d] (0.00)	3.51[c] (11.94)	4.50[b] (20.00)	±0.061 0.000
	Tarde 14:00-18:00	0.70[d] (0.00)	9.39[a] (87.77)	9.21[a] (84.72)	

a, b, c, d Medias con superíndices no comunes difieren significativamente a $p < 0.05$ (Tukey), ( ) Datos originales en minutos.

Tabla 3. Efecto del tratamiento y sesión del día en las actividades al sol.
Table 3. Effect of treatment and daily session on activities under the sun.

Actividades	Sesión (horas)	Pastoreo			± EE p
		Al sol 47 ± 5 lux	Con *Leucaena* 34 ± 3 lux	Con *Manguifera* 16 ± 3 lux	
Rumiar al sol	Mañana 8:00-12:00	3.10[b] (9.16)	0.70[d] (0.00)	0.70[d] (0.00)	± 0.024 0.000
	Tarde 14:00-18:00	7.00[a] (48.61)	1.34[c] (1.38)	0.70[d] (0.00)	
Descansar al sol	Mañana 8:00-12:00	5.25[b] (27.22)	1.94[c] (3.33)	0.70[e] (0.00)	± 0.036 0.000
	Tarde 14:00-18:00	8.94[a] (79.44)	1.55[d] (1.94)	0.70[e] (0.00)	

a, b, c, d, e Medias con superíndices no comunes difieren significativamente a p < 0.05 (Tukey), ( ) Datos originales en minutos.

Manguifera, respectivamente. El tiempo que los animales dedicaron a otras actividades fue mayor cuando pastorearon con Leucaena en la sesión de la mañana y menor en la sesión de la tarde cuando pastorearon con menor nivel de radiación solar (*Leucaena* y *Maguifera*).

La actividad rumiar a la sombra (Tabla 2) presentó el mayor valor en el pastoreo con Leucaena en la sesión de la tarde, mientras que en el pastoreo con Manguifera en la sesión de la tarde fue mayor que cuando pastaron con árboles en la sesión de la mañana. El pastoreo al sol, con mayor nivel de radiación solar no permitió a los animales la opción de realizar actividades conductuales de preferencia a la sombra. La rumia a la sombra, en los tratamientos con menor nivel de radiación solar (*Leucaena* y *Manguifera*), en la sesión de la tarde, representaron el 18.4 y 15.5 % del tiempo en dicha sesión.

Los ovinos dedicaron mayor tiempo al descanso a la sombra cuando estuvieron expuestos a un nivel medio y menor de radiación solar en el pastoreo (*Leucaena* y *Maguifera*) respectivamente durante la sesión de la tarde (Tabla 2). En este sentido, el tiempo total a la sombra, registró un comportamiento semejante con el descanso a la sombra. El pastoreo de los ovinos en cuartones con *Leucaena* y *Manguifera*, favoreció que dedicaran el 20.7 y 21.8 % del tiempo total de pastoreo a actividades a la sombra, respectivamente.

La actividad de rumia al sol fue mayor en los animales que pastorearon al sol en la sesión de la tarde, seguido de este mismo grupo en la sesión de la mañana (Tabla 3). En los tratamientos con árboles esta actividad no fue preferida por los animales en la sesión de la mañana, ni en la sesión de la tarde para el tratamiento con menor nivel de radiación solar (*Manguifera*). Por otra parte, el descanso al sol alcanzó los mayores valores en el pastoreo al sol, con mayor nivel de radiación solar, en la sesión de la tarde, que representó el 33.1 % del tiempo total de pastoreo en dicha sesión. En el tratamiento con árboles de Leucaena se registró un nivel menos preferido de esta actividad, mientras que en el pastoreo con Maguifera no se registró la misma. Se obtuvieron correlaciones altas y negativas (Tabla 4) para el tiempo dedicado a pastar-caminar al considerar el dedicado a rumiar a la sombra (- 0.98), el dedicado a descansar a la sombra (- 0.96) y el tiempo total a la sombra (- 0.99).

DISCUSIÓN

La actividad de pastar-caminar ocupó el mayor tiempo en las ovejas (Tabla 1), resultado que se explica por el tiempo de pastoreo, de ocho horas al día, y la necesidad de satisfacer las necesidades de consumo de pastos. En otros estudios, Alvarado-Canché *et al*. (2017) constataron en seis horas de pastoreo en sistemas silvopastoriles con *Leucaena leucocephala*, 140 y 117 min que los ovinos dedicaron al consumo de alimentos, en la sesión mañana y tarde, respectivamente, resultados inferiores a los del presente estudio, en los tratamientos con árboles. Lo anterior pudiera explicarse por el menor tiempo de observación en pastoreo que utilizaron estos autores. En contraste, Silva *et al*. (2015) obtuvieron tiempos dedicados al pastoreo en ovejas, entre 354 y 357 min al día, en diez horas contínuas de observación en pastoreo.

El comportamiento obtenido (Tabla 1) indicó un mayor aprovechamiento del tiempo en pastoreo. Los animales dedicaban más de la mitad del tiempo al consumo de alimentos, con mayor aprovechamiento del tiempo de pastoreo

Tabla 4. Correlaciones entre la actividad pastar y las actividades realizadas a la sombra en los tratamientos con árboles.
Table 4. Correlations between grazing activity and activities carried out in the shade in the treatments with trees.

Actividades		Rumiar a la sombra	Rumiar al sol	Descansar a la sombra	Descansar al sol	Tiempo total a la sombra
Pastar-caminar	r	-0.98	-0.53	-0.96	0.20	- 0.99
	p	0.000	0.007	0.000	0.343	0.00

restringido para poder cubrir sus necesidades de ingestión de materia seca. Solórzano-Montilla *et al.* (2018) constatan la importancia del pastoreo en los ovinos en clima cálido, con la presencia de sombra, donde las ovejas pastaron en áreas de pastos naturales, con bajo valor nutritivo y dedicaron una alta proporción del tiempo al consumo de los mismos.

La intensidad de radiación solar en el sistema de pastoreo afectó el comportamiento etológico de las ovejas, con mayores tiempos a la actividad de pastar-caminar cuando se realizó asociado a árboles (Tabla 1). El horario de la mañana fue más preferido para esta actividad en presencia de árboles. Estos resultados pueden explicarse por varios factores como las condiciones ambientales y de mayor bienestar térmico que garantizan los árboles en las áreas de pastoreo, con una reducción de la intensidad de la radiación solar. Estas condiciones influyen favorablemente para que los animales satisfagan sus necesidades fisiológicas (Doughty *et al*., 2016; Hinch, 2017).

Resultados diferentes obtuvieron Solórzano-Montilla *et al*. (2018), en ovejas mestizas West African, quienes reportaron un efecto de la presencia de sombra en el pastoreo, con mayor proporción del tiempo a esta actividad cuando las ovejas pastorearon sin presencia de sombra, comparado con sombra artificial. Resultados que pueden estar explicados por la mayor preferencia a la sombra, en detrimento del tiempo al pastoreo, cuando tuvieron acceso a la misma en un clima tropical. Así mismo, por el manejo del pastoreo de los animales, si se tiene en cuenta que estaban sometidos a un pastoreo restringido de 8:00 a 15:00 horas, lo que implicaba un mayor aprovechamiento del tiempo en la actividad de pastar.

La interacción obtenida entre la intensidad de radiación solar y la sesión del día para la actividad pastar-caminar indica que los animales prefirieron realizar un mayor pastoreo en las horas más frescas del día, mientras que la presencia de árboles contribuyó a incrementar el tiempo en esta actividad comparado con el pastoreo al sol, en las horas más calurosas (tarde). En este sentido, una mayor proporción del tiempo en pastoreo en la sesión de la mañana fue reportada por Zambrano *et al*. (2010) en ovinos en un sistema silvopastoril con árboles de Samán (*Pithecellobium saman*) y Guácimo (*Guazuma ulmifolia*).

Los resultados obtenidos se relacionan con lo señalado por De Oliveira *et al*. (2013), quienes observaron una mayor intensidad de pastoreo en la mañana y al final de la tarde en ovejas Santa Inés. Así como los de Barreto *et al*. (2020) y Karvatte Junior *et al*. (2020) quienes señalaron que en los sistemas silvopastoriles la intercepción de la radiación directa de los rayos del sol puede modificar los parámetros del microclima y mejorar el bienestar térmico en los animales. Otros autores (Pent *et al*., 2020) obtuvieron resultados comparables al presente estudio, al estudiar la conducta de ovinos en tres sistemas pastoriles, uno con árboles de *Junglans nigra* L. (Nogal negro americano) , otro con árboles *Gleitsia triacanthos* L. (acasia de tres espinas) y el pastoreo abierto sin árboles. Estos autores encontraron que los ovinos que pastaron en el sistema donde la sombra fue más profunda (*Junglans nigra* L.), que la sombra disponible de los árboles de acasia (*Gleitsia triacanthos* L.) pasaron más tiempo pastando y lo hicieron con más frecuencia y de manera más uniforme durante las horas del mediodía en comparación con los otros sistemas.

Las actividades (Tabla 2) a la sombra presentaron interacción entre la intensidad de radiación solar del sistema de pastoreo y la sesión del día. Los animales dedicaron más tiempo tanto a rumiar como a descansar a la sombra en la sesión de la tarde, cuando tuvieron acceso a los árboles en el pastoreo. El pastoreo de las ovejas en las dos variantes de sistema silvopastoril de regeneración natural y de baja densidad de árboles (con *Leucaena* y *Manguifera*) puede favorecer los patrones de conductas, pues los animales tienen la opción de realizar actividades a la sombra de los árboles donde existen menores valores de radiación solar. En este sentido, Pinto *et al*. (2014) y Guevara *et al.* (2016) plantearon que la disponibilidad y características de los alimentos ofertados en los sistemas silvopastoriles, influyeron en el tiempo que dedican al consumo de alimentos y contribuye a favorecer el tiempo al descanso y rumia en estos sistemas.

Los resultados de las actividades (Tabla 1 y 2) se relacionan con los de van Cleef *et al*. (2021) quienes estudiaron el efecto del pastoreo sin sombra y dos arreglos de árboles (con sombra moderada y sombra intensa, con 786 y 1190 árboles por hectárea de *Eucaliptus grandis*, respectivamente), en la conducta de ovinos. Determinaron que los animales que pastorearon en el sistema con sombra intensa pasaron más tiempo echados, parados y en otras actividades, comparados con los animales que pastorearon al sol y con sombra moderada. Estos autores determinaron que el sistema silvopastoril fue eficiente para evitar el estrés por calor y mejoró el bienestar térmico de los ovinos.

En este sentido, Vieira *et al.* (2021) obtuvieron que las ovejas expuestas en ambiente de sombra en un sistema silvopastoril con árboles de Laureles marrones (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud.) pasaron menos tiempo parados en reposo, mientras que tuvieron mayor preferencia por caminar y pastar a través del día, especialmente durante el periodo más caluroso, después de las 15:00 horas. Las ovejas en el silvopastoreo experimentaron menor carga de calor radiante y expresaron un comportamiento de bienestar térmico, comparado con el sistema de pastoreo al sol.

Los mayores tiempos dedicados tanto a la rumia como al descanso al sol (Tabla 3) se presentaron en los ovinos sometidos al pastoreo al sol. La reducción de la radiación solar debajo de los árboles favoreció que los tiempos a la rumia y descanso al sol fueran menores. Se destacó el tratamiento con menor radiación solar (*Manguifera*) donde los animales no realizaron actividades al sol. Estos resultados pueden estar explicados por las características de los árboles y la proyección de la sombra, que debajo de los árboles de *Manguifera indica* presentaron los menores valores de radiación solar. En este sentido, en estos sistemas se requieren estudios que relacionen otros indicadores, como los fisiológicos y ambientales (la humedad relativa).

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la presencia de árboles en los sistemas pastoriles y se pueden asociar con las condiciones más favorables de bienestar térmico a la sombra de estos. Al respecto, Reyes *et al.* (2018) plantearon que la sombra natural o artificial promueve mecanismos de enfriamiento de los animales. Así mismo, la reducción del tiempo dedicado al consumo y rumia, el incremento del tiempo en la posición de pie y el jadeo son conductas que evidencian reducciones del bienestar térmico (Lima *et al.* 2014; De *et al.* 2017).

Los resultados del presente estudio se relacionan con los obtenidos por Karvatte Junior *et al*. (2016) quienes estudiaron sistemas silvopastoriles con alta densidad de árboles (227 y 357 árboles/ha) y encontraron cambios en el microclima con una reducción entre 2 y 9 ºC en la temperatura del aire debajo de los árboles, asociado a las características morfológicas y densidad de los árboles. En este sentido, la densidad y orientación de los árboles en los sistemas silvopastoriles pueden mejorar el bienestar, con pocas horas de estrés térmico y poca carga radiante. Así mismo, los sistemas silvopastoriles pueden ayudar a la adaptación al cambio climático de los sistemas ganaderos por los cambios en el microclima inducido por los árboles (Pezzopane *et al*., 2019).

El comportamiento de las ovejas en pastoreo (Tabla 2 y 3) se relaciona con otras investigaciones, donde se demostró la preferencia por la sombra artificial en ovejas, que la usaron para pastorear, descansar echadas, rumiar de pie y echadas, en las horas más calurosas del día (Solórzano-Montilla *et al*., 2018). Al respecto, López *et al*. (2015) sugieren que podría ser una solución para mitigar el efecto de la temperatura ambiente por reducción del calor extra en el animal debido a la disminución de la carga radiante. Así mismo, la sombra natural puede modificar el ambiente térmico en áreas de pastoreo (Sousa *et al*., 2015) y la inclusión de los árboles en los sistemas pastoriles puede aumentar la calidad de la biomasa de la ración (López-Vigoa *et al*., 2017; López-Ortiz *et al*., 2021).

Las correlaciones obtenidas (Tabla 4) explican el comportamiento inverso que las ovejas realizaron en las actividades de pastar-caminar en relación con la rumia y el descanso, ambas a la sombra. Los resultados obtenidos mostraron que los animales tienen preferencia por el descanso y rumia bajo la sombra de árboles en relación con el descanso al sol en estos sistemas silvopastoriles. Silva *et al.* (2015) indicaron que la mayor intensidad del pastoreo y la rumia ocurrían en la mañana, y asociaron tal conducta a las mejores condiciones climáticas durante ese horario. En este sentido, la preferencia de sombra fue asociada con el tiempo total en la actividad de rumia y descanso en sistemas con árboles, a un tiempo proporcionalmente mayor a estas actividades a medida que los animales pastorearon en sistemas con 5, 227 y 357 árboles por hectárea (Oliveira *et al*., 2021).

En este sentido, según Macías-Cruz *et al.* (2016) y Macías-Cruz *et al.* (2018) las ovejas pueden desarrollar mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales para adaptarse bien a altas temperaturas, estos criterios coinciden con Vicente *et al*. (2020), quienes plantearon que los ovinos de pelo son más resistentes a los efectos del calor comparados con otras especies. Al respecto, es importante continuar con los estudios para relacionar la conducta con indicadores ambientales (índice de temperatura y humedad), parámetros fisiológicos (temperatura y frecuencia respiratoria) de los animales en estos sistemas de pastoreo con diferentes niveles de radiación solar y diferentes niveles de densidad de árboles.

Cândido *et al*. (2023) señalaron que los sistemas silvopastoriles reducen el perfil de calor comparado con las condiciones de pastos totalmente expuestos a la radiación solar, los servicios del ecosistema proveidos por los árboles influyen en la regulación térmica del sistema. En este sentido, las condiciones microclimáticas explican la mayor presencia de animales en el sistema silvopastoril en busca del bienestar térmico que proveen los árboles, especialmente en las horas de mayor temperatura del día.

CONCLUSIONES

La conducta de las ovejas en pastoreo fue afectada por las interacciones entre la intensidad de radiación solar en el pastoreo y la sesión del día. Los menores niveles de radiación solar, por la presencia de árboles en el sistema de pastoreo, favoreció que los ovinos dedicaran más tiempo al sistema pasta-caminar en la sesión matutina. La reducción de la radiación solar bajo la copa de los árboles favoreció el comportamiento etológico de las ovejas. Los animales realizaron actividades bajo la sombra de los árboles con preferencia en la sesión vespertina. En el sistema silvopastoril con menor radiación solar (*Manguifera indica*) los animales no prefirieron las actividades de rumia y descanso al sol.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses relacionados con esta publicación.

REFERENCIAS

Alvarado-Canché, A., Candelaria-Martínez, B., Castillo-Sánchez, L. E., Piñeiro-Vázquez, A. T. y Canul-Solis, J. R. 2017. Comportamiento productivo y alimenticio de ovinos en pastoreo en sistemas silvopastoriles con Leucaena leucocephala y Cynodon plectostachyus. Revista Bio Ciencias. 4(6): 1-11.

Anon. 2023. Grupo de bienestar animal. Departamento de Sanidad Animal, Ministerio de la Agricultura provincial, Ciego de Ávila, Cuba.

Barreto, C.D., Alves, F.V., de Olivera Ramos, C.E.C de O., Leite, M.C. de P., Leite, L.C. y Karvatte Junior, N. 2020. Infrared thermography for evaluation of the environmental thermal comfort for livestock. International Journal of Biometeorology. 64(5): 881-888.

Borroto, A., Peña, P., Negrín, A., Pérez, A.M., Ramírez, I. y Sotuyo, N. 2019. Impactos de la transferencia de saberes en fincas ovinas y cunícolas de Ciego de Ávila. Universidad & Ciencia. 8(Especial): 146-163.

Borroto, A., Pérez-Carmenate, R., Mazorra, C.A., Pérez-Carmenate, A., Barrabí, M. y Arencibia, A.C. 2011. Caracterización socioeconómica y tecnológica de la producción ovina en Ciego de Ávila, región Central de Cuba (Parte I). Pastos y Forrajes. 34(2): 199-210.

Cândido, A. T., Guerreiro Martorano, L., Cândido, B. U., Nascimento, W., Dias, C. T., Lisboa, L. S., Fernandes, P. C., Silva, A. R., Dias-Filho, M. B., y Beldini, T. P. 2023. Infrared thermal profiles in silvopastoral and full-sun pastures in the eastern Amazon, Brazil. Forests. 14(7): 1463.

CMP. 2020. Centro provincial de meteorología Ciego de Ávila. Estación Meteorológica del Territorio (78346) Venezuela.

Corbea, L.A. y García Trujillo, R. 1982. Método de muestreo en pastos y forrajes. Matanzas, Cuba: Mimeo. EEPF Indio Hatuey, 1982.

De Oliveira, F.A. de, Turco, S.H.N., Aaraújo, G.G.L. de., Clemente, C.A.A., Voltolini, T.V. y Garrido, M.S. 2013. Comportamento de ovinos da raça Santa Inês em ambientes com e sem disponibilidade de sombra. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 17(3): 346-351.

De, K., Kumar, D., Saxena, V. K., Thirumurugan, P. y Naqvi, S.M.K. 2017. Effect of high ambient temperature on behavior of sheep under semiarid tropical environment. International Journal of Biometeorology. 61(7): 1269-1277.

Doughty, A.K., Ferguson, D., Matthews, L.R. y Hinch, G.N. 2016. Assessing feeding motivation in sheep using different behavioural demand models and measures. Applied Animal Behaviour Science. 180: 43-50.

Guevara, R., Roca, A., Lascano, P., Arcos, C., Vera, J., Guevara, G.V., Curbelo, L., Galarza, D. y Soto, S. 2016. Influencia del algarrobo en la conducta y producción de leche de vacas en pastoreo. II. Período lluvioso. Revista de Producción Animal. 28(1): 10-15.

Herrera, J., Jordán, H. y Senra, A.F. 2010. Aspectos del manejo y alimentación de la reproductora ovina Pelibuey en Cuba. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 44(3): 211-219.

Hinch, G. N. 2017. *Understanding the natural behaviour of sheep*. Edited by: Drewe M. Ferguson, Caroline Lee and Andrew Fisher. *In: Advances in Sheep Welfare*. 1-15. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100718-1.00001-7.

Karvatte Junior, N., Klosowski, E.S., Almeida, R.G., Mesquita, E.E., Oliveira, C.C. y Alves, F.V. 2016. Shading effect on microclimate and thermal comfort indexes in integrated crop-livestock-forest systems in the Brazilian Midwest. International Journal of Biometeorology. 60(12): 1933-1941.

Karvatte Junior, N., Myage, E.S., de Oliveira, C.C., Barreto, C.D., Mastelaro, A.P., Bungenstab, D.J. y Villa, F.A. 2020. Infrared thermography for microclimate assessment in agroforestry systems. Science of The Total Environment. 731: 139252.

Lima, C.B., Costa, T.G.P., Nascimiento, T.L., Júnior, D.M.L., Silva, M.J.M.S. y Mariz, T.M.A. 2014. Comportamento ingestivo e respostas fisiológicas de ovinos em pastejo no semiárido. Journal of Animal Behaviour and Biometeorology. 2(1): 26-34.

López, R., Pinto, L.S., Perozo, D., Pineda, J., Oliveros, I., Chacón, T., Rossini, M., y Ríos de Álvarez, L. 2015. Confort térmico y crecimiento de corderas West African pastoreando con y sin acceso a sombra artificial. Archivos de Zootecnia. 64(246): 139-146.

López-Ortiz, S., Valenzuela-González, V., Pérez-Ramírez, E., Vargas-Mendoza, M., Jarillo-Rodríguez, J., Salazar-Ortiz, J., y Diaz-Rivera, P. 2021. Foraging behaviour and dry matter intake by lambs in a silvopastoral system.. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Sp. 2: e2913.

López-Vigoa, O., Sánchez, T., Iglesias, J.M., Lamela, L., Soca, M., Arece, J. y Milera, M. 2017. Los sistemas silvopastoriles como alternativa para la producción animal sostenible en el contexto actual de la ganadería tropical. Pastos y Forrajes. 40(2): 83-95.

Macías-Cruz, U., Gastélum, M.A., Avendaño, L.R., Correa, A.C., Mellado, M., Chay, A.C. y Arechiga, C.F. 2018. Variaciones en las respuestas termoregulatorias de ovejas de pelo durante los meses de verano en un clima desértico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 9(4): 738-753.

Macías-Cruz, U., López-Baca, M.A., Vicente, R., Mejía, A., Álvarez, F.D., Correa-Calderón, A., Meza-Herrera, C., Mellado, M., Guerra-Liera, J., y Avendaño-Reyes, L. 2016. Effects of seasonal ambient heat stress (spring vs. summer) on physiological and metabolic variables in hair sheep located in an arid region. International Journal of Biometeorology. 60(8): 1279-1286.

Oliveira, C.C., Giolo, R., Karvatte, N., Delmar, S., Bungenstab, D.J. y Villa, F. 2021. Daytime ingestive behaviour of grazing heifers under tropical silvopastoral systems: Responses to shade and grazing management. Applied Animal Behaviour Science. 240: 1-7. 105360.

Pent, G.J., Greiner, S.P., Munsell, J.F., Tracy, B.F. y Fike, J.H. 2020. Lamb performance in hardwood silvopastures, II: animal behavior in summer. *Translational Animal Science*. 4(1): 363-375.

Petit, M. 1972. Emploi du temps des tropeaux de vaches-mères et de leurs veaux sur les pâturages d'altitude de l'aubrac. Annales de Zootechnie. 21(1): 5-27. https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00887147.

Pezzopane, J.R.M., Nicodemo, M.L.F., Bosi, C., Garcia, A.R. y Lulu, J. 2019. Animal thermal comfort indexes in silvopastoral systems with different tree arrangements. Journal of thermal biology. 79: 103-111.

Pinto, R., Ortega, L., Gómez, H., Guevara, F. y Hernández, D. 2014. Comportamiento animal y características de la dieta de bovinos pastoreando estrella africana sola y asociada con árboles. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 5(3): 365-374.

Reyes, J., Herrera, M., Marquina, J.R., Enjoy, D.D. y Pinto-Santini, L. 2018. Ambiente físico y respuestas fisiológicas de ovinos bajo sombra en horas de máxima radiación. Archivos de Zootecnia. 67(259): 318-323.

Silva, T.P., Marques, C.A., Torreão, J.N., Bezerra, L.R., Araújo, M.J., Gottardi, F.P., Edvan, R.L. y Oliveira, R.L. 2015. Ingestive behaviour of grazing ewes given two levels of concentrate. South African Journal of Animal Science. 45(2): 180-187.

Solórzano-Montilla, J., Pinto-Santini, L., Camacaro-Calvete, S., Vargas-Guzmán, D. y Ríos-de Álvarez, L. 2018. Efecto de la presencia de sombra en áreas de pastoreo de ovinos. 2. Actividad animal. Pastos y Forrajes. 41(1): 41-49.

Sousa, L.F., Maurício, R.M., Paciullo, D.S.C., Silveira, S.R., Ribeiro, R.S., Calsavara, L.H. y Moreira, G.R. 2015. Forage intake, feeding behavior and bio-climatological indices of pasture grass, under the influence of trees, in a silvopastoral system. Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales. 3(3): 129-141.

Sousa, M.S., de Oliveira, M.E., Leal, T.M., Martins, M., Azevedo, A., Fiares, W., Luis, A. y Zacharias, M. 2022. Productivity performance of sheep in silvopastoral systems with cashew tree compared to grass monoculture. Journal of Agricultural Studies. 10(2): 36-51.

SPSS, Statistical Package for the Social Sciences (2011). Institute. SPSS-X. User´s Guide. Version 8, Chicago IL. USA.

van Cleef, F.O.S., van Cleef, E.H.C., de Abreu Santos, D.J., Ribas, C.M., Longhini, V.Z. y Ruggieri, A.C. 2021. Physiological and behavioural responses of sheep grazing in a tropical silvopastoral system. Animal Production Science. 61(15): 1564-1574.

Vicente, R., Macías, U., Avendaño, L., Correa, A.C., de los Ángeles, M. y Lara, A.L. 2020. Impacto del estrés por calor en la producción de ovinos de pelo. Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 11(1): 205-222.

Vieira, F.M.C., Pilatti, J.A., Czekoski, Z.M.W., Fonsêca, V.F.C., Herbut, P., Angrecka, S., de Souza Vismara, E., de Paulo Macedo, V., dos Santos, M.C.R., y Paśmionka, I. 2021. Effect of the silvopastoral system on the thermal comfort of lambs in a subtropical climate: A preliminary study. *Agriculture. 11,* 790.

Zambrano, C., Altuve, E., Zambrano, L. y Parraga, C. 2010. Conducta de ovinos a pastoreo en sistema silvopastoril tradicional con predominio de Samán (*Pithecellobium saman*) y Guácimo (*Guazuma ulmifolia*). Revista Unellez de Ciencia y Tecnología. (Volumen Especial): 29-34.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Estudio preliminar de las propiedades físicas y antibacteriales de películas de almidones modificados de avena mezclados con quitosano

Preliminary study of physical and antibacterial properties of films of modified oats starches mixed with chitosan

Juan Manuel Tirado-Gallegos[1], Paul Baruk Zamudio-Flores[2]*✉, Juan Carlos Bustillos-Rodríguez[2], Carlos Horacio Acosta-Muñiz[2], Rogelio Calderón-Loera[2], Miguel Ángel López-Mata[3], Glenda Pacheco-Vargas[4], María Hernández-González[5], Haydeé Yajaira López-De la Peña[5], Adalberto Ortega-Ortega[6], Gilber Vela-Gutiérrez[7], Vicente Espinosa-Solis[8]

[1] Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Periférico Francisco R. Almada km. 1, C.P. 31453, Chihuahua, Chihuahua, México.
[2] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc, Fisiología y Tecnología de alimentos de la Zona Templada. Avenida Río Conchos s/n, Col. Parque Industrial, Apartado postal 781, C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Teléfono: 625 5812920, 21 y 70, Ext. 111.
[3] Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Ciudad Obregón, Sonora, México.
[4] Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, km 6 carretera Yautepec-Jojutla, Calle Ceprobi No. 8, Colonia San Isidro, C.P 62731, Yautepec, Morelos, México.
[5] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 2315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
[6] Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Extensión Cuauhtémoc, Barrio de la Presa s/n, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, C.P. 31510.
[7] Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales, Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29000.
[8] Coordinación Académica Región Huasteca Sur, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. km 5, Carretera Tamazunchale-San Martín, Tamazunchale, San Luis Potosí, México, C.P. 79960.

RESUMEN

Se realizó una modificación física (autoclaveado) y cinco modificaciones químicas (lintnerización, entrecruzamiento, acetilación, hidroxipropilación y oxidación) al almidón nativo de avena. Los almidones se mezclaron con quitosano (Q) y plastificante (glicerol) para elaborar películas. Las soluciones formadoras de película (SFP) se caracterizaron reológicamente. En las películas se evaluaron las propiedades físicas (color, grosor, humedad y solubilidad), la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (10 y 25 °C) y las propiedades mecánicas. Se evaluó la actividad antibacteriana frente a Eschericia coli, Staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes mediante el método de difusión en agar. La funcionalidad de las películas como envase de carne picada de cerdo se evaluó mediante el recuento de coliformes fecales y aerobios totales durante 21 días a 4°C. Todas las SFP presentaron comportamiento pseudoplástico. La adición de Q aumentó la tensión a la fractura (TF) y disminuyó el porcentaje de elongación (% E) en todas las películas; siendo la formulación Oxidado-Q la que presentó el mayor incremento (≈ 200 %) en TF y la menor disminución (38 %) en %E. Todas formulaciones con Q presentaron actividad antibacterial, la cual fue mayor en la película Oxidado-Q y disminuyó con el tiempo de evaluación. En general, los resultados indicaron que la película Oxidado-Q puede representar una formulación conveniente como envase antibacteriano con adecuadas propiedades físicas, mecánicas y de barrera.

Palabras clave: Películas degradables, autoclaveado, lintnerización, propiedad antibacterial, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad.

ABSTRACT

One physical modification (autoclaving) and five chemical modifications (lintnerization, crosslinking, acetylation, hydroxypropylation, and oxidation) were performed on the native oat starch. The starches were mixed with chitosan (Ch) and plasticizer (glycerol) to make films. The film-forming solutions (FFS) were characterized rheologically and evaluated for physical properties (color, thickness, humidity and solubility), water vapor and oxygen permeability (10 and 25 °C), and mechanical properties. Antibacterial activity was evaluated against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes by the agar diffusion. The functionality of the films as packaging in ground pork was evaluated by counting fecal coliforms and total aerobes for 21 days at 4°C. All the FFS presented a pseudoplastic-type behavior. The addition of Ch increased the stress at fracture (TF) and decreased the percentage elongation (% E) in all the films; being the Oxidized-Ch formulation the one that presented the greatest increase (≈ 200 %) in TF and the smallest decrease (38 %) in % E. All formulations with Ch presented antibacterial activity, which was higher in the Oxidized-Ch film and decreased with the evaluation time. The results

*Autor para correspondencia: Paul Baruk Zamudio-Flores
Correo-e: pzamudio@ciad.mx
Recibido: 20 de junio de 2023
Aceptado: 29 de febrero de 2024
Publicado: 5 de abril de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2072

generally indicated that the Oxidized-Ch film may represent a suitable formulation as antibacterial packaging with adequate physical, mechanical, and barrier properties.
Keywords: Degradable films, autoclaving, lintnerization, antibacterial property, water vapor permeability, solubility.

INTRODUCCIÓN

El uso de películas biodegradables como envases para conservar la calidad de los alimentos ha aumentado de manera considerable en los últimos años. Estas películas se elaboran a partir de biopolímeros renovables y naturales con el objetivo de reducir los problemas de contaminación ambiental causados por el uso excesivo de envases sintéticos no biodegradables (Mali *et al.*, 2006; Biduski *et al.*, 2017). El almidón es un biopolímero que ha sido ampliamente utilizado para elaborar películas biodegradables, obteniéndose comercialmente de diversas fuentes botánicas como la papa (Wu *et al.*, 2009), maíz (Cheng *et al.*, 2010) y trigo (Delville *et al.*, 2003). Sin embargo, el almidón de algunos cereales como la avena ha sido muy poco estudiado en la elaboración de películas biodegradables, a pesar de que se ha reportado que forma películas con propiedades mecánicas y de barrera similares a las que se obtienen de las fuentes comerciales (Galdeano *et al.*, 2014; Zamudio-Flores *et al.*, 2015). Generalmente se considera que las películas de almidón nativo presentan algunas desventajas en comparación con los materiales plásticos sintéticos comunes, las cuales son atribuidas principalmente a su carácter hidrofílico y a su tendencia a la retrogradación (Mali *et al.*, 2005; Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008). Para reducir estas desventajas y diversificar sus aplicaciones, el almidón ha sido modificado químicamente (Zamudio-Flores *et al.*, 2010; Pérez-Gallardo *et al.*, 2012), además de que ha sido mezclado con otros biopolímeros, como el quitosano (Shen *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2014). Actualmente existen diversos reportes sobre películas de almidones modificados mezclados con quitosano, un biopolímero policatiónico, que además de formar películas biodegradables, presenta propiedades antimicrobianas (Ruiz-Navajas *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2014).

Por otra parte, la modificación química del almidón nativo reduce su carácter hidrofílico (Arijaje *et al.*, 2014; Osundahunsi *et al.*, 2014) e incrementa las propiedades mecánicas y de barrera de sus películas (López *et al.*, 2008; Zamudio-Flores *et al.*, 2010), así como también otorga diversas funcionalidades a las películas elaboradas con este polisacárido (López *et al.*, 2010; Lago-Vanzela *et al.*, 2013; Zamudio-Flores y Bello-Pérez, 2013). Debido a que el almidón químicamente está conformado por unidades de anhidroglucosa, las cuales presentan grupos hidroxilo (OH^-) en las posiciones del C-2, C-3 y C-6, la modificación química del almidón se logra con la sustitución de estos OH^- por grupos éster (acetilación), éter (hidroxipropilación) y carboxilo (oxidación), así como por el entrecruzamiento por grupos que estabilizan las estructuras de cadenas adyacentes (Rutenberg y Solarek, 1984; Wurzburg, 1986; López *et al.*, 2008).

Comparado con otros almidones, el almidón de avena (60 % del peso del grano) destaca por presentar un contenido superior en lípidos (1-3 %), lo que puede conducir a incrementar el carácter hidrofóbico de sus películas, reduciendo así su permeabilidad al vapor de agua, una de las más grandes desventaja en este tipo de materiales (Galdeano *et al.*, 2014). Aunque ya se han reportado algunos estudios sobre películas de almidón de avena, al momento no existen investigaciones sobre almidones modificados por tratamientos físicos y químicos a partir de esta fuente y de sus mezclas con quitosano, ni tampoco del efecto antibacterial en estas películas biodegradables. Por tal razón, en este estudio se realizó una modificación física (autoclaveado) y cinco modificaciones químicas (lintnerización, entrecruzamiento, acetilación, hidroxipropilación y oxidación) a un almidón nativo de avena con dos objetivos:

1) Preparar películas con los almidones modificados y evaluar el efecto de las modificaciones y la inclusión de quitosano sobre sus propiedades físicas, mecánicas y de barrera, y 2) Determinar por medio de difusión en placa el efecto de la adición de quitosano sobre las propiedades antibacteriales de las películas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron 5 kg de avena (*Avena sativa* L.) descascarillada, procedentes de Canadá, obtenidos de la compañía Avenas del Norte S.A. de C.V. (Cuauhtémoc, Chihuahua, México). El quitosano (% de desacetilación = 75 – 85 %; peso molecular = medio (250 kDa); viscosidad = 200 cps) y todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico, adquiridos en Sigma-Aldrich, Co. (Toluca, Estado de México, México).

Aislamiento del almidón y modificación física por autoclaveado

El almidón se aisló de acuerdo con la metodología reportada por Zamudio-Flores y Bello-Pérez (2013). La modificación física se realizó siguiendo el protocolo reportado por Berry (1986). Para lo cual se preparó una dispersión con 60 g y 210 mL de agua. Posteriormente, esta dispersión se autoclaveó (121 °C, 103 kPa) durante 1 h, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) y se almacenó a 4 °C por 24 h. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente se liofilizó, se molió en un mortero y se tamizó (tamiz estándar de 70 µm, US 200) para homogeneizar el tamaño de las partículas. Este proceso de molienda y tamizado se realizó después del secado en todas las modificaciones.

Lintnerización

La lintnerización o también llamada como hidrólisis ácida se realizó mediante la metodología reportado por Shin *et al.* (2003). Para lo cual, se pesaron 500 g de almidón de avena y se mezclaron con 400 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1 N a 35 °C bajo agitación constante (50 rpm) por 6 h. Posteriormente se adicionaron 400 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N a pH 6.0. Los sólidos del almidón se lavaron 6 veces, utilizando 1500 mL de agua destilada en cada lavado. Finalmente, la mezcla se secó en una estufa de convección (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Cornellius, Oregon, USA) a 45 °C durante 24 h.

Entrecruzamiento

Para el entrecruzamiento se utilizó el método reportado por Seib y Woo (1999). Para lo cual, 50 g de muestra se mezclaron con 70 mL de agua destilada, 5.6 g de tripolifosfato de sodio, 10 g de sulfato de sodio y 11 g de trimetafosfato de sodio. El pH de la mezcla se ajustó a 11.5 con la adición de NaOH 1 N. Posteriormente, la dispersión se agitó constantemente y se calentó a 45 °C por 3 h. Después de este tiempo, el pH de la dispersión se ajustó a 6.5 con HCl 1 N y se realizó un lavado, dejando un tiempo de 5 h de reposo. La suspensión se secó en una estufa a 45 °C durante 8 h, para obtener el almidón modificado.

Oxidación

El almidón nativo de avena se oxidó con hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración de 0.5 % de cloro activo siguiendo la metodología reportada por Wang y Wang (2002). Se mezclaron 200 g de almidón (base seca) en 371 g de agua destilada. Esta dispersión se conservó a una temperatura de 35 °C y el pH se ajustó a 9.5 con NaOH 2 N. Se añadieron, gota a gota, 100 mL de NaOCl al 0.5 % de cloro activo, conservando el pH a 9.5 con H_2SO_4 1 N. Después de agregar el NaOCl, el pH se ajustó a 9.5 con NaOH 2 N por 50 min. Al termino de este tiempo, el pH de la mezcla se neutralizó (pH = 7.0) con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N, se filtró al vacío y se lavó con agua millipore para enseguida secarla a 40 °C por 48 h.

Determinación de grupos carbonilo

Los grupos carbonilo (C=O) se determinaron utilizando la metodología reportada por Smith (1967). Se realizó una suspensión de 4 g de almidón (nativo y oxidado) en 100 mL de agua destilada. La muestra se gelatinizó en un baño de agua hirviendo por 20 min, después se enfrío a 40 °C. El pH se ajustó a 3.2 con HCl 0.1 N y se agregaron 15 mL de clorhidrato de hidroxilamina (NH_2OH). Posteriormente la dispersión se dejó a 40 °C en un baño de agua con agitación lenta por 4 h. El excedente de hidroxilamina se tituló a pH 3.2 con HCl 0.1N.

El contenido de grupos carbonilo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%\,\text{Carbonilos} = \frac{\left[\left(\text{Blanco - Muestra}\right)\text{mL} \times \text{N ácido} \times 0.028 \times 100\right]}{\text{Peso muestra (base seca) en g}}$$

Determinación de grupos carboxilo

El contenido de grupos carboxilo (COOH) del almidón oxidado se determinó con el procedimiento modificado por Chattopadhyay *et al.* (1997). Se mezclaron 2 g de almidón (nativo y oxidado) con 25 mL de HCl 0.1 N, se agitó ocasionalmente por 30 min. La dispersión se filtró al vacío y se lavó con 400 mL de agua destilada. La pasta obtenida se mezcló con 300 mL de agua destilada; la nueva dispersión se gelatinizó en agua hirviendo por 15 min con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se agregaron 150 mL de agua destilada a temperatura ambiente (25 ± 3 °C), se disminuyó la temperatura a 35 ± 4 °C, y se tituló a pH 8.3 con NaOH 0.01 N.

Para calcular el porcentaje carboxilo se determinaron los miliequivalentes de acidez con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Miliequivalentes de acidez}}{\text{100 g de almidón}} = \frac{\left[\left(\text{Muestra - Blanco}\right)\text{ mL} \times \text{N NaOH} \times 0.028 \times 100\right]}{\text{Peso muestra (base seca) en g}}$$

$$\%\,\text{Carboxilos} = \frac{\left[\left(\text{miliequivalentes de acidez}\right) \times 0.045\right]}{\text{100 g de almidón}}$$

Donde 0.028 son los miliequivalentes del grupo carbonilo, N NaOH es la normalidad del NaOH y 0.045 son los miliequivalentes del grupo carboxilo.

Acetilación

Se empleó la metodología propuesta por Wurzburg (1986), para la cual se obtuvo una dispersión con 162 g de almidón nativo y 220 mL de agua destilada con agitación constante durante toda la modificación. El pH se ajustó a 8.0 con NaOH 0.75 N y se adicionó gota a gota de anhídrido acético [$(CH_3CO)_2O$] 0.1 M; simultáneamente se adicionó NaOH 0.75 N para mantener el pH entre 8.0 y 8.4. Al terminar de agregar el $(CH_3CO)_2O$, el pH se ajustó a 4.5 con HCl 0.5 N. La solución se centrifugó durante 15 min a 755 × *g*, decantando el sobrenadante para generar una nueva suspensión en agua destilada y nuevamente centrifugar. Este procedimiento se repitió tres veces más. El almidón obtenido se secó en una estufa convectiva a 45 °C por 24 h. Finalmente, se molió, tamizó y almacenó hasta su posterior empleo.

Determinación de porcentaje de grupos acetilo

Para esta determinación se utilizó el método reportado por Wurzburg (1986). Se pesaron 5 g en base seca de almidón (nativo y modificado) y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionaron 50 mL de agua destilada y se neutralizó con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. Se añadieron 25 mL de NaOH 0.45 N y la suspensión se mezcló vigorosamente con un agitador magnético por 30 min. La muestra saponificada se tituló con HCl 0.2 N empleado fenolftaleína como indicador.

El porcentaje de grupos acetilo es la cantidad en peso de grupos acetil en el almidón en base seca, y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%\,\text{Acetilos} = \frac{\left[\left(\text{Blanco - Muestra}\right)\text{ mL} \times \text{N ácido} \times 0.043 \times 100\right]}{\text{Peso muestra (base seca) en g}}$$

Donde N ácido representa la normalidad del ácido y 0.043 son los miliequivalentes del grupo acetilo.

Determinación del grado de sustitución

Para la determinación del grado de sustitución se empleó el método reportado por Wurzburg (1986). En donde el grado de sustitución es representado por el número promedio de grupos hidroxilos (OH) que son reemplazados por unidad de anhidroglucosa y se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de sustitución (GS)} = \frac{162 \times \%\,\text{Acetilos}}{4300 - (42 \times \%\,\text{Acetilos})}$$

Donde 162 es el peso molecular de la unidad de anhidroglucosa, 4300 es el producto del peso molecular del grupo acetil por 100, 42 es el peso molecular del grupo acetil – 1.

Elaboración de las películas de almidón adicionadas con quitosano

La elaboración de las películas de almidón nativo, almidones modificados y de sus mezclas con quitosano se realizó con la metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Para la película de quitosano (Q) se preparó una solución formadora de película (SFP) de este biopolímero al 3 % (p/p). En el caso de las formulaciones a base de almidón nativo o modificados (Almidón nativo, Autoclaveado, Lintnerizado, Entrecruzado, Acetilado, Hidroxipropilado y Oxidado) se prepararon SFP de cada almidón (4 %, p/p) por separado. Finalmente, para las películas a base de almidón con quitosano (Almidón nativo-Q, Autoclave-Q, Lintnerizado-Q, Entrecruzado-Q, Acetilado-Q, Hidroxipropilado-Q y Oxidado-Q), se mezclaron 250 g de SFP de quitosano (3 %, p/p) y 250 g de SFP de almidón nativo o modificado (4 %, p/p) para formar lotes de 500 g totales de SFP. En todas las formulaciones se incluyó glicerol como plastificante al 2 % (p/p, en base a la masa total de la SFP).

Determinación de viscosidad de las soluciones formadoras de películas (SFP)

Para determinar la viscosidad aparente de las SFP se realizaron curvas de flujo utilizando un reómetro AR1500ex (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) con la geometría de placas paralelas, equipado con un sistema Peltier a una temperatura controlada de 30 °C. La muestra de SFP (1.5 mL) se depositó entre las placas con un gap de 500 µm. La viscosidad se determinó en función del aumento en la velocidad de deformación de 0.452 a 600 s^{-1}. Las curvas se ajustaron utilizando el modelo reológico de Ostwald-de Wael también nombrado como Ley de Potencia: $\tau = k\gamma^n$; donde: τ = Esfuerzo cortante (Pa), γ = Velocidad de corte ó deformación (s^{-1}), *k* = Coeficiente de consistencia ($Pa.s^n$), *n* = Índice de comportamiento de flujo (adimensional) (Steffe, 1996).

Propiedades *físicas* de las películas

Determinación del color

El color tri-estímulo de las películas se evaluó con un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta, Osaka, Japón). Las lecturas se registraron en el espacio de color de acuerdo con la escala CIELAB (L*, a*, b*). Las lecturas se tomaron en cinco puntos aleatorios de la superficie de las películas utilizando como fondo el estándar blanco que se usó en la calibración del equipo. Además, se midió el cambio de color (ΔE) de las películas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = (\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L2)^{1/2}$$

Donde Δa = a* estándar - a* muestra , Δb = b* estándar - b* muestra y ΔL = L* estándar - L* muestra.

Determinación de humedad, solubilidad y grosor de las películas

El contenido de humedad se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2015). Las películas se acondicionaron durante 24 h a una humedad relativa (HR) de 52 % con una solución salina de NaBr. Se secaron muestras de 0.5 g de cada película en una estufa convectiva (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Cornellius, Oregon, USA) a 106 °C durante 2 h. El contenido de humedad se reportó como la media aritmética de diez repeticiones para cada formulación de película. La solubilidad de las películas se realizó a 25 y a 80 °C, de acuerdo a la metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2015). Para lo cual, se cortaron piezas de películas (2 × 3 cm), se pesaron y colocaron en vasos de precipitados de 150 mL y se adicionaron 80 mL de agua desionizada. Las muestras se conservaron bajo agitación constante (250 rpm) en una placa de calentamiento y agitación controlada (Corning, Modelo PC-620D, EUA) a 25 °C o a 80 °C durante 1 h, posteriormente, las muestras se deshidrataron a 60 °C. El porcentaje de materia soluble [Solubilidad (%)] se determinó de la siguiente manera: Solubilidad (%) = [Pesos inicial de la muestra – Peso de la muestra seca)/Peso inicial de la muestra] × 100. El grosor de las películas se midió utilizando un micrómetro digital manual (Mitutoyo Corporation, Modelo IP 65 Coolant Proof, Kobe, Japón) considerando al menos 10 posiciones aleatorias sobre la superficie de la película de acuerdo con la metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2006).

Determinación de las propiedades barrera

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La determinación de PVA se realizó mediante la metodología gravimétrica estándar ASTM-E96-80 (2016). Las películas se cortaron en círculos de 9 cm de diámetro, se acondicionaron en un desecador con una solución de NaBr a una HR de 52 %. Las películas se sujetaron en la parte superior de las celdas de prueba, las cuales contenían sílica gel para generar una HR ≈ 0 %. Cada celda se colocó dentro de un desecador con una HR de 60 % generada por una solución saturada de NaCl. El cambio en el peso de las celdas se registró cada hora durante 7 h. La pendiente de la variación en peso contra el tiempo (después de alcanzar el estado estacionario) se determinó por regresión lineal y se utilizó para calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua a través de las películas. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado a una temperatura de 25 °C para cada formulación de película. El grosor promedio y el área de contacto de las películas se utilizaron para el cálculo de la permeancia y la permeabilidad.

Permeabilidad al oxígeno (PO)

La PO se realizó de acuerdo al método estándar ASTM-D3985-05 (2010). La velocidad de PO se determinó con un sistema Ox-Tran 1/50 (Mocon, Minneapolis, MN, EUA) a la temperatura de 10 y 25 °C. Un lado de la película se expuso a un flujo de nitrógeno puro y el otro a un flujo de oxígeno. Las pruebas se realizaron en modo continuo a 55 ± 3 % de HR, dependiendo de la temperatura. La PO se determinó como el cociente de la velocidad de transmisión de oxígeno y el gradiente de presión parcial entre los dos lados de la película, multiplicado por el grosor promedio de la película. Las pruebas se efectuaron por triplicado para cada película.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas TF (tensión a la fractura), ME (módulo de elasticidad) y %E (porcentaje de elongación) se determinaron conforme a la norma estándar ASTM-882-95a (1995), con un analizador de textura universal TAXTPlus (Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipado con un par de mordazas (Texture Technologies, Co., UK.) con una velocidad de tensión de 24 mm min^{-1}. La TF es la fuerza que una película puede soportar al aplicar la tensión de tracción antes de que la estructura de la película se rompa, y se calculó como el cociente de la fuerza máxima entre el área de sección transversal (determinada como el producto del grosor por el ancho de la película). El %E se determinó como el cambio en porcentaje de la longitud inicial de la película entre las mordazas. La TF y el %E se determinaron en rectángulos de películas de 6 × 1 cm. Las películas se acondicionaron previamente a una HR de 55 ± 2 % en un desecador con una solución saturada de NaBr. El ME se determinó mediante la pendiente obtenida del comportamiento lineal de la curva del esfuerzo en función de la deformación. Se efectuaron 10 réplicas para cada formulación de las películas.

Evaluación de la actividad antibacterial

La actividad antibacterial de las películas se evaluó con dos metodologías: a) La primera por difusión en agar como lo reportaron Rojas-Graü *et al.* (2006), utilizando las bacterias de *Listeria monocytogenes* (ATCC15313)*, Staphylococcus aureus* (ATCC6538) y *Escherichia coli* (ATCC8739), obtenidas de cepas proporcionadas por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., (Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México). Las bacterias crecieron en caldo tripticaseína enriquecido con 0.6 % (p/v) de extracto de levadura bajo agitación continua durante 24 h. Se inocularon tres mL de este caldo en 150 mL de caldo fresco y se mantuvo en agitación constante por 1 h a 25 °C. Se colocaron 25 mL del agar soya tripticaseína en cajas de Petri, una vez que solidificó se transfirió una alícuota (0.05 mL) del cultivo. Se recortaron círculos de película con 3 mm diámetro y se depositaron sobre el agar. Las muestras se incubaron a 35 °C durante 48 h. El efecto antibacterial de la película se determinó tomando mediciones en la formación de halos de inhibición alrededor de la película. b) La segunda metodología fue la reportada por Bonilla *et al.* (2013). Se utilizó carne molida de puerco moldeada en cubos de 5 cm^3 (≈ 5.5 g), cada cubo de carne se cubrió con una película y se colocó en una caja Petri a 4 °C, con HR de 55 % durante 24 h. Se tomaron 10 g de cada muestra y se homogeneizaron en una batidora modelo Robot 180 (Taurus España, S.A. de C.V.) con 90 mL de una solución amortiguadora de peptona (SAP) esterilizada por 2 min, a partir de la cual se realizaron diluciones. Se determinaron los recuentos de microorganismos totales viables y coliformes fecales a los 2, 7, 14 y 21 d. Para los conteos viables, las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Los conteos de coliformes fecales se determinaron utilizando placas de agar bilis rojo violeta incubadas a 37 °C por 48 h. Para cada tratamiento se envolvieron 24 cubos por separado, los conteos se realizaron por triplicado para cada película formulada.

Análisis estadístico

Los experimentos se efectuaron empleando un diseño completamente al azar. Para el análisis de los datos se utilizó un análisis de varianza de un factor mediante el programa estadístico Sigma-Stat, versión 2.03 (Fox *et al.*, 1995). Cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas, se usó la prueba de Tukey para la comparación de medias ($P \leq 0.05$) (Walpole *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de grupos carbonilo, carboxilo, acetilo y grado de sustitución (GS)

El contenido de grupos carbonilo y carboxilo en el almidón oxidado fue de 0.19 ± 0.01 % y 0.11 ± 0.02 %, respectivamente. El contenido de grupos carboxilo fue mayor al valor (0.039 %) reportado por Liu *et al.* (2014) en almidones de maíz oxidados con peróxido de hidrógeno, aunque estos investigadores no reportaron el contenido de grupos carbonilo; sin embargo, tanto el contenido de grupos carbonilo como carboxilo fueron similares a los reportados por otros investigadores en muestras de almidones de cebada, maíz (Chávez-Murillo *et al.*, 2008), papa, arroz y maíz oxidados todos con 0.8 y 2 % de hipoclorito de sodio (Kuakpetoon y Wang, 2001). El almidón acetilado presentó un porcentaje de grupos acetilo de 39.5 % con un GS de 1.15. Estos resultados son similares al porcentaje de acetilación de 41.3 % y GS de 1.24 reportados por Teodoro *et al.* (2015) en nano-partículas de almidón acetilado de cassava, el cual fue utilizado como material reforzante para la elaboración de películas termoplásticas. Las diferencias detectadas en el contenido de grupos carbonilo, carboxilo y acetilo en los almidones pueden ser atribuidas al arreglo de la amilosa y amilopectina en una estructura semi-cristalina, a poros o fracturas de la estructura granular, al tamaño de los gránulos, los cuales son particulares para cada fuente botánica del almidón (Wurzburg, 1986; Chávez-Murillo *et al.*, 2008).

Caracterización reológica de las soluciones formadoras de película (SFP)

El análisis del comportamiento reológico de las SFP permite establecer el comportamiento de su flujo durante el procesamiento antes de convertirse en películas (Bof *et al.*, 2015). Con base en el modelo de ley de potencia, se observó que todas las SFP presentaron un índice de comportamiento de flujo (n) < 1, indicando un comportamiento del tipo corte adelgazante (pseudoplástico) con valores que oscilaron de 0.95 en el tratamiento Hidroxipropilado a 0.61 en el Lintnerizado-Q, con una $R^2 > 0.96$ (Tabla 1). La adición de quitosano (Q) en las SFP provocó una disminución significativa ($P < 0.05$) de n en todas las formulaciones, lo cual concuerda con lo reportado por Bonilla *et al.* (2013). Comparando las diversas formulaciones, observamos que las mayores reducciones de n con respecto al Nativo se presentaron en las muestras Lintnerizado-Q y Autoclave-Q, con valores de reducción de ≈ 33 y 27.5 %, respectivamente. Los valores de n de este estudio son similares a los reportados por López *et al*. (2008; 2010) en almidones modificados de maíz.

Tabla 1. Variables reológicas de índice de comportamiento de flujo (*n*), índice de consistencia (*k*) y bondad del ajuste (R^2) del modelo Ley de Potencia de las soluciones formadoras de película (SFP)*.
Table 1. Rheological variables of flow behavior index (*n*), consistency index (*k*) and goodness of fit (R^2) of the film-forming solutions (FFS)* Power Law model.

SFP	Variables reológicas		
	n (adimensional)	*k* (Pa.s^n)	R^2
Almidón nativo	0.91 ± 0.05^{f}	23.18 ± 1.67^{e}	0.985
Autoclave	0.94 ± 0.03^{f}	20.41 ± 2.12^{d}	0.981
Lintnerizado	0.91 ± 0.01^{f}	18.75 ± 1.00^{c,d}	0.991
Entrecruzado	0.85 ± 0.04^{e}	15.69 ± 0.90^{b}	0.990
Acetilado	0.91 ± 0.01^{f}	17.83 ± 1.01^{b,c,d}	0.981
Hidroxipropilado	0.95 ± 0.01^{f}	18.56 ± 0.85^{c,d}	0.987
Oxidado	0.92 ± 0.03^{f}	25.81 ± 0.98^{f}	0.961
Quitosano (Q)	0.84 ± 0.01^{e}	26.95 ± 1.10^{f}	0.970
Nativo-Q	0.72 ± 0.02^{c}	24.61 ± 0.39^{e}	0.985
Autoclave-Q	0.66 ± 0.01^{b}	13.80 ± 0.12^{a}	0.991
Lintnerizado-Q	0.61 ± 0.08^{a}	25.15 ± 1.11^{f}	0.978
Entrecruzado-Q	0.70 ± 0.05^{c}	26.25 ± 0.90^{f,g}	0.968
Acetilado-Q	0.71 ± 0.10^{c}	27.78 ± 0.90^{g}	0.980
Hidroxipropilado-Q	0.70 ± 0.01^{c}	28.59 ± 0.78^{h}	0.975
Oxidado-Q	0.78 ± 0.08^{d}	35.85 ± 1.26^{i}	0.983

*Valores expresados como la media de cinco replicas ± error estándar. Diferencias estadísticas significativas en cada columna son expresadas mediante diferente letra (P < 0.05).
*Values expressed as the mean of five replicates ± standard error. Significant statistical differences in each column are identified by a different letter (P < 0.05).

El índice de consistencia (*k*) varió de ≈ 14 a 36 Pa.s^n en las muestras de Autoclave-Q y Oxidado-Q, respectivamente (Tabla 1); sin embargo, no se observaron diferencias significativas (P > 0.05) entre las muestras Autoclave, Lintnerizado, Acetilado e Hidroxipropilado. La adición de Q incrementó de manera significativa el valor *k* en los tratamientos Lintnerizado, Entrecruzado, Acetilado, Hidroxipropilado y Oxidado, con mayor efecto en esta última muestra (≈ 10 %), sin que se observara diferencia significativa (P > 0.05) en la muestra de Nativo. Además, en el autoclaveado se observó un patrón diferente, debido a que el valor disminuyó de 20.4 a 13.8 Pa.s^n. Estos resultados pueden explicarse en función de los valores obtenidos en *k* para la SFP de Q puro, el cual fue mayor (*k* ≈ 27 Pa.s^n) a los valores de las SFP de los almidones antes de ser mezclados con Q. Se ha reportado que en las soluciones de Q se puede incrementar la viscosidad al mezclarse con soluciones de almidón, debido a la formación de redes o entramados tridimensionales entre las cadenas adyacentes de las unidades de glucosamina del Q, y por puentes de hidrógeno de los grupos hidroxilo (OH^-) de las unidades de anhidro-glucosa del almidón (Chillo *et al*., 2008; Bof *et al*., 2015; Dang y Yoksan, 2015).

Propiedades físicas de las películas

Color

El color de las películas puede afectar las características visuales del producto cubierto (Fonseca *et al*., 2015). El tratamiento físico y los químicos en los almidones, afectaron el color de sus películas (Tabla 2) en comparación con las películas de Nativo. La película de almidón sometido a autoclave presentó la menor luminosidad (fue mayormente obscura) con un valor de luminosidad (L*) de 85.11, comparada con las películas de Nativo (L* ≈ 95). Esto pudo deberse a reacciones de oscurecimiento no enzimático (reacciones de Maillard) que se propiciaron por el tratamiento de calor-humedad y presión, debido a la reacción entre los grupos amino (presentes en proteínas residuales del almidón) y los grupos carbonilo de azúcares reductores (producidos por la hidrólisis del almidón) (Martinez-Alvarenga *et al*., 2014). Las películas de Oxidado y Oxidado-Q presentaron la mayor claridad (L* = 97.40 y 98.16, respectivamente), lo cual coincide con valores previamente reportados en películas de almidón oxidado de plátano (Zamudio-Flores *et al*., 2010; García-Tejeda *et al*., 2013), cassava (Famá *et al*., 2007), papa (Fonseca *et al*., 2015; Zavareze *et al*., 2012) y almidón de maíz (El Halal *et al*., 2015). Durante la oxidación, el cloro residual (ya sea como ácido hipocloroso o ion hipoclorito) actúa sobre los compuestos fenólicos involucrados en las reacciones de oscurecimiento enzimático, reduciéndolas y causando una decoloración (blanqueamiento) (Sánchez-Rivera *et al*., 2005; Zamudio-Flores *et al*., 2010). Por otra parte, la variable de color a* en las películas, presentó de manera general valores positivos cercanos a 0 (cero), lo que es indicativo de una tonalidad verde; así mismo, los valores de la variable b* fueron todos positivos, esto indicó que las películas tendieron hacia la tonalidad

Tabla 2. Evaluación de color en películas de almidón nativo, quitosano, almidones modificados y sus mezclas con quitosano*.
Table 2. Color evaluation in films of native starch, chitosan, modified starches and their mixtures with chitosan*.

Película	L*	a*	b*	ΔE
Almidón nativo	94.65 ± 0.27^{e}	0.16 ± 0.02^{d}	2.92 ± 0.03^{b}	14.88 ± 2.20^{a,b}
Autoclave	85.11 ± 0.14^{a}	-0.19 ± 0.01^{a}	5.06 ± 0.02^{e}	12.19 ± 0.06^{a}
Lintnerizado	90.63 ± 0.19^{b}	0.07 ± 0.03^{b,c}	3.69 ± 0.16^{c}	18.85 ± 0.27^{e}
Entrecruzado	92.15 ± 0.21^{d}	0.45 ± 0.01^{f}	1.25 ± 0.11^{a}	14.78 ± 0.21^{b}
Acetilado	93.78 ± 0.18^{e}	0.51 ± 0.05^{g}	6.13 ± 0.10^{f}	15.21 ± 0.15^{c}
Hidroxipropilado	92.45 ± 0.35^{d}	0.61 ± 0.08^{h}	4.89 ± 0.20^{d}	12.33 ± 0.41^{a}
Oxidado	98.16 ± 0.06^{g}	0.06 ± 0.01^{b}	2.68 ± 0.02^{b}	18.73 ± 0.17^{e}
Quitosano (Q)	92.80 ± 0.33^{d}	0.28 ± 0.08^{e}	4.17 ± 0.28^{d}	11.28 ± 1.13^{a}
Nativo-Q	93.10 ± 0.16^{e}	0.45 ± 0.10^{f,g}	7.18 ± 0.65^{g}	10.11 ± 1.10^{a}
Autoclave-Q	90.25 ± 0.20^{b}	0.15 ± 0.02^{d}	8.10 ± 0.18^{h}	12.08 ± 0.98^{a}
Lintnerizado-Q	92.16 ± 0.18^{d}	0.25 ± 0.05^{e}	7.11 ± 0.21^{g}	18.15 ± 1.10^{e}
Entrecruzado-Q	91.14 ± 0.45^{c}	0.08 ± 0.01^{c}	6.65 ± 0.11^{f}	17.12 ± 0.85^{d}
Acetilado-Q	93.00 ± 0.87^{e}	0.12 ± 0.02^{d}	7.35 ± 0.20^{g}	15.10 ± 1.08^{b,c}
Hidroxipropilado-Q	92.85 ± 0.33^{d}	0.40 ± 0.17^{f}	5.40 ± 0.15^{e}	12.11 ± 1.11^{a}
Oxidado-Q	97.40 ± 1.08^{f,g}	0.90 ± 0.18^{i}	5.13 ± 0.58^{e}	10.17 ± 0.95^{a}

*Valores expresados como la media de tres replicas ± error estándar. Diferencias estadísticas significativas en cada columna son expresadas mediante diferente letra (P < 0.05).
*Values expressed as the mean of three replicates ± standard error. Significant statistical differences in each column are identified by a different letter (P < 0.05).

amarilla, lo cual pudiera ser debido a la fuente botánica del almidón (Tirado-Gallegos *et al*., 2018). En lo que respecta al cambio de color (ΔE), las modificaciones incrementaron esta variable; mientras que la inclusión de Q en la formulación de las películas redujo los valores de ΔE. El cambio de color es perceptible para el observador promedio cuando ΔE es mayor a 5 o 6, por lo que, el gradiente de color de los materiales se percibió a simple vista (López-Díaz *et al*., 2018).

Grosor

El grosor de las películas estuvo dentro del intervalo de 0.199 mm (en las películas Nativo) hasta 0.216 mm (en las películas de Q) (Tabla 3). De manera general, la incorporación de Q prácticamente no tuvo efecto sobre la variable de grosor, ya a pesar de que se observaron ligeros incrementos en todas las formulaciones, estos incrementos no fueron significativos ($P > 0.05$). Estos valores son mayores a los reportados en películas de Q con almidón de frijol mungo (0.074-0.093 mm) reportado por Mei *et al.* (2013), y menores a los de películas de almidón de maíz con Q termoplástico obtenidas por extrusión (0.75 - 0.83 mm) (Mendes *et al*., 2016). Los resultados indican que además de la formulación, el grosor de las películas depende de las condiciones del procesamiento y la velocidad del calentamiento durante el secado de la solución formadora de película (Bonilla *et al*., 2013; Lopez *et al*., 2014).

Solubilidad y humedad

Los resultados del contenido de humedad y solubilidad en agua de las películas a las temperaturas de 25 y 80 °C se muestran en el Tabla 4. En lo que respecta al contenido de humedad de las películas, este valor varió de manera significativa en función del tipo de modificación del almidón, con valores que oscilaron entre el 9.19 y 15.24 % películas Acetilado-Q y Oxidado, respectivamente). Los valores más altos fueron registrados para las películas de almidón Oxidado y Oxidado-Q con 15.24 y 14.94 %, respectivamente. Por otra parte, los valores más bajos de humedad fueron observados en las películas Acetilado y Acetilado-Q con 8.13 y 9.19 %, respectivamente. Estos resultados se deben a que la oxidación provoca la formación de grupos carbonilo y carboxilos que incrementan el carácter hidrofílico de las películas, mientras que la acetilación incrementa la hidrofobicidad por la inserción de grupos acetilo por esterificación (Zamudio-Flores *et al*., 2010).

Por otra parte, se observó que la solubilidad aumentó cuando incrementó la temperatura en todas las formulaciones, probablemente por un aumento en la energía cinética que ocasiona el rompimiento en las cadenas de la matriz estructural de almidón (Zamudio-Flores *et al*., 2015). Las películas de Acetilado presentaron la menor solubilidad (≈ 17 y 20 %) a ambas temperaturas de estudio, lo que puede ser una consecuencia de la presencia de grupos hidrofóbicos acetilos generados por esta modificación (Jiménez-Regalado *et al*., 2021). Por otra parte, las películas de Oxidado-Q presentaron la mayor solubilidad con 38 y 42 % para las temperaturas de 25 y 80 °C, respectivamente. En comparación con la película de Nativo, observamos que la modificación por oxidación incrementó el porcentaje de solubilidad (en la película Oxidado) en ≈ 26 y 10 % para la temperatura de 25 y 80 °C, es importante señalar que esta formulación también presentó el mayor contenido de humedad. Si consideramos que la película de Q presentó una solubilidad de ≈ 22 y 28 % para las temperaturas ambiente (25 °C) y de calentamiento (80 °C), respectivamente, podríamos inferir que, al adicionar este polisacárido a las formulaciones de las películas, habría de disminuir esta variable. Sin embargo, no se aprecia una clara tendencia en las películas cuando se adicionó el quitosano. Finalmente, una mayor solubilidad en agua podría mejorar la biodegradabilidad de la película, aunque limitaría su factible aplicación en alimentos con un alto contenido de humedad (Singh y Sharma, 2008; Souza *et al*., 2017).

Tabla 3. Evaluación del grosor y propiedades mecánicas (TF: tensión a la fractura, %E: porcentaje de elongación y ME: módulo de elasticidad) de películas de almidón nativo, quitosano, almidones modificados y sus mezclas*.
Table 3. Evaluation of the thickness and mechanical properties (stress at fracture: TF, %E: percentage of elongation and ME: modulus of elasticity) of films of native starch, chitosan, modified starches and their mixtures*.

Película	Grosor (mm)	TF (MPa)	%E	ME (MPa)
Almidón nativo	0.199 ± 0.001^{a}	6.28 ± 0.27^{b}	30.41 ± 3.22^{d}	184.15 ± 12.41^{b}
Autoclave	$0.202 \pm 0.004^{a,b}$	4.60 ± 1.90^{a}	51.84 ± 3.64^{f}	111.40 ± 32.74^{a}
Lintnerizado	0.205 ± 0.003^{b}	5.70 ± 0.90^{a}	45.07 ± 6.53^{e}	311.50 ± 17.10^{c}
Entrecruzado	0.210 ± 0.002^{c}	7.80 ± 0.85^{c}	$25.15 \pm 5.50^{c,d}$	410.15 ± 10.25^{d}
Acetilado	0.211 ± 0.001^{c}	6.75 ± 0.90^{b}	29.10 ± 2.20^{d}	320.17 ± 11.15^{c}
Hidroxipropilado	0.206 ± 0.002^{b}	7.95 ± 0.45^{c}	30.25 ± 2.56^{d}	422.15 ± 10.20^{d}
Oxidado	0.214 ± 0.002^{d}	9.17 ± 0.33^{e}	30.21 ± 2.40^{d}	539.35 ± 12.66^{f}
Quitosano (Q)	0.216 ± 0.005^{d}	7.78 ± 0.52^{c}	26.18 ± 1.58^{c}	500.10 ± 10.14^{e}
Nativo-Q	0.208 ± 0.004^{c}	7.90 ± 0.63^{c}	28.11 ± 1.20^{d}	518.21 ± 12.60^{e}
Autoclave-Q	0.200 ± 0.002^{a}	5.51 ± 0.78^{a}	40.50 ± 2.60^{e}	325.16 ± 13.41^{c}
Lintnerizado-Q	0.199 ± 0.001^{a}	6.21 ± 0.90^{b}	31.17 ± 1.80^{d}	330.25 ± 11.40^{c}
Entrecruzado-Q	$0.207 \pm 0.003^{b,c}$	9.28 ± 0.58^{e}	25.20 ± 1.11^{c}	550.18 ± 17.80^{f}
Acetilado-Q	0.210 ± 0.005^{c}	8.50 ± 0.75^{d}	23.80 ± 1.18^{b}	515.20 ± 10.45^{e}
Hidroxipropilado-Q	0.208 ± 0.003^{c}	10.14 ± 0.91^{f}	$22.65 \pm 2.10^{a,b}$	510.11 ± 8.77^{e}
Oxidado-Q	0.206 ± 0.002^{b}	18.17 ± 0.80^{g}	18.78 ± 2.15^{a}	585.35 ± 12.14^{g}

*Valores expresados como la media de tres replicas ± error estándar. Diferencias estadísticas significativas en cada columna son expresadas mediante diferente letra ($P < 0.05$).*Values expressed as the mean of three replicates ± standard error. Significant statistical differences in each column are identified by a different letter ($P < 0.05$).

Propiedades de barrera

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua es una medida de la cantidad de vapor de agua que pasa a través de una unidad de área del material, por unidad de tiempo (McHugh y Krochta, 1994). Los biopolímeros utilizados para elaborar películas comestibles son generalmente hidrofílicos, debido a que contienen grupos polares que interactúan con las moléculas de agua permeantes, incrementando su movilidad, y como consecuencia, la PVA (Basiak *et al*., 2017). La PVA de las películas varió de ≈ 11.8×10^{-11} a ≈ 47.7×10^{-11} g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}, para las muestras de las películas Acetilado y Oxidado, respectiva-

Tabla 4. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO), contenido de humedad y solubilidad en las películas de almidón nativo, quitosano, almidones modificados y sus mezclas con quitosano*.
Table 4. Determination of water vapor (WVP) and oxygen (PO) permeability, moisture content and solubility in films of native starch, chitosan, modified starches and their mixtures with chitosan*.

Película	Humedad (%)	PVA ($g\ m^{-1}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$) $\times 10^{-11}$	PO ($cm^3\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}$ día^{-1})		Solubilidad (%)	
			10 °C	25 °C	25 °C	80 °C
Almidón nativo	12.88 ± 0.25^{e}	40.39 ± 1.09^{g}	0.05 ± 0.01^{a}	0.07 ± 0.01^{b}	30.14 ± 0.75^{e}	39.02 ± 0.98^{g}
Autoclave	12.51 ± 0.22^{e}	38.38 ± 2.04^{f}	0.03 ± 0.01^{a}	0.06 ± 0.02^{a}	27.90 ± 0.66^{d}	34.20 ± 0.51^{f}
Lintnerizado	13.96 ± 0.43^{f}	34.31 ± 1.89^{e}	0.03 ± 0.02^{a}	0.07 ± 0.01^{b}	28.18 ± 0.81^{d,e}	31.12 ± 0.47^{d}
Entrecruzado	13.25 ± 0.50^{f}	35.23 ± 2.58^{e}	0.04 ± 0.01^{a}	0.07 ± 0.02^{b}	25.63 ± 1.15^{c}	31.19 ± 1.06^{d}
Acetilado	8.13 ± 0.21^{a}	11.73 ± 0.60^{a}	0.09 ± 0.03^{b}	0.11 ± 0.01^{c}	17.07 ± 0.68^{a}	20.45 ± 0.57^{a}
Hidroxipropilado	10.18 ± 0.32^{c}	28.12 ± 1.15^{c}	0.10 ± 0.02^{b}	0.13 ± 0.03^{c,d}	24.36 ± 0.83^{c}	28.46 ± 0.89^{b}
Oxidado	15.24 ± 0.51^{g}	47.65 ± 2.18^{h}	0.11 ± 0.01^{b}	0.15 ± 0.02^{d}	37.87 ± 0.53^{f}	43.17 ± 1.12^{h}
Quitosano (Q)	11.58 ± 0.36^{d}	32.28 ± 1.95^{d}	0.20 ± 0.01^{e}	0.17 ± 0.02^{d}	22.41 ± 1.03^{b}	28.30 ± 0.81^{b}
Nativo-Q	13.17 ± 0.25^{f}	37.91 ± 1.53^{f}	0.15 ± 0.03^{c}	0.18 ± 0.04^{d,e}	29.92 ± 0.69^{e}	33.76 ± 1.11^{e}
Autoclave-Q	12.58 ± 0.91^{e}	35.19 ± 2.45^{e,f}	0.17 ± 0.02^{c}	0.21 ± 0.03^{e}	25.28 ± 0.64^{c}	28.38 ± 0.55^{b}
Lintnerizado-Q	13.10 ± 0.75^{f}	30.14 ± 1.35^{d}	0.18 ± 0.02^{c,d}	0.23 ± 0.02^{e}	27.22 ± 1.30^{d}	33.13 ± 0.97^{e}
Entrecruzado-Q	12.69 ± 0.53^{e}	28.19 ± 0.98^{c}	0.15 ± 0.01^{c}	0.22 ± 0.03^{e}	27.10 ± 1.00^{d}	30.40 ± 0.67^{c}
Acetilado-Q	9.19 ± 0.48^{b}	10.95 ± 1.78^{a}	0.19 ± 0.01^{d}	0.24 ± 0.03^{e}	20.14 ± 0.80^{b}	22.82 ± 0.92^{b}
Hidroxipropilado-Q	10.68 ± 0.61^{c}	20.85 ± 1.14^{b}	0.20 ± 0.02^{e}	0.25 ± 0.02^{e}	25.28 ± 0.74^{c}	31.60 ± 1.12^{d}
Oxidado-Q	14.94 ± 0.17^{g}	32.95 ± 2.41^{d}	0.21 ± 0.02^{e}	0.25 ± 0.03^{e}	38.15 ± 0.88^{f}	41.75 ± 0.68^{h}

Valores expresados como la media de tres replicas ± error estándar. Diferencias estadísticas significativas en cada columna son expresadas mediante diferente letra ($P < 0.05$). Values expressed as the mean of three replicates ± standard error. Significant statistical differences in each column are identified by a different letter ($P < 0.05$).

mente (Tabla 4). Los valores de PVA de este trabajo son similares a los reportados por López *et al.* (2010) en películas de mezclas de almidones acetilados y nativos de maíz. Asimismo, concuerdan con los valores reportados por Palma-Rodríguez *et al.* (2012) y Bof *et al.* (2015) en películas de almidón oxidado de plátano y en películas de Q de diferentes pesos moleculares mezcladas con almidón de maíz, respectivamente. La adición de Q redujo la PVA en todas las formulaciones, esto se puede atribuir a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales presentes en el quitosano y el almidón, lo cual reduce los grupos disponibles en la matriz y con ello la velocidad de transmisión de moléculas de vapor de agua (Chillo *et al.*, 2008; Bof *et al.*, 2015).

Permeabilidad al oxígeno (PO)

Las películas de almidón pueden actuar como barrera a gases como el oxígeno, alargando la vida de anaquel de los productos cubiertos con ellas (Shen *et al.*, 2010; Bonilla *et al.*, 2013). La adición de Q incrementó la PO de las películas en todas las formulaciones (Tabla 4). Las películas sin Q mostraron valores de PO de 0.03 a 0.11 y a 0.06 a 0.15 $cm^3\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}$ día^{-1}, a 10 y 25 °C, respectivamente; mientras que en las películas con Q la PO fue de 0.17 a 0.21 y de 0.21 a 0.25 $cm^3\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}$ día^{-1} a 10 y 25 °C, respectivamente. Estos valores indican que en general, la PO incrementó con la temperatura a la que fueron evaluadas las películas. El aumento en la temperatura podría implicar un mayor movimiento molecular en la película, favoreciendo la transferencia de masa, haciendo las películas de mayor permeabilidad y con una mayor movilidad del oxígeno (Bonilla *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha reportado que la adición de Q en películas de almidón reduce la PO de las películas, como lo indicaron Dang y Yoksan (2016) en películas de almidón termoplástico con 1.45 % de Q y Shen *et al.* (2010) en películas de almidón de papa adicionadas con 15 % de Q. Estos investigadores argumentaron que la PO se redujo por la formación de una capa cristalina superficial debida al Q, y por la formación de puentes de hidrógeno entre el almidón y el Q, lo cual redujo el volumen y la movilidad intermolecular de las cadenas de almidón. El aumento de la PO por la adición de Q en este trabajo puede ser atribuido a varios factores, como el tipo de almidón (el cual determina la relación de amilosa/amilopectina), el procedimiento realizado para elaborar las películas y las variables e instrumentos de medición utilizados, como lo sugieren Dang y Yoksan (2016).

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas se evaluaron mediante la determinación de su tensión a la fractura (TF), módulo de elasticidad (ME) y porcentaje de elongación (%E). La TF se considera como el esfuerzo máximo de tensión que una película puede soportar antes de romperse (Lopez *et al.*, 2014). El %E es la capacidad que presentan los materiales para estirarse antes de romperse y ME es una medida de la dureza de la película, representada por la relación del esfuerzo a la deformación sobre la parte lineal de su curva (Ozdemir y Floros, 2008; López-Mata *et al.*, 2016). Los resultados se muestran en el Tabla 3. En todas las formulaciones de películas, la

adición de Q aumentó de manera significativa ($P < 0.05$) la TF, siendo mayor el efecto en la formulación Oxidado-Q (con un incremento de ≈ 200 %, debido a que este incrementó de 9.2 MPa para la formulación Oxidado a 18.2 MPa en la película Oxidado-Q). Por otra parte, en un comportamiento inverso, los valores del porcentaje de elongación de las películas de almidón (%E = 25.15 - 51.84 %) disminuyeron cuando se incluyó quitosano en la formulación (%E = 18.78 - 40.50 %), sugiriendo materiales de menor flexibilidad. La mayor reducción en el porcentaje de elongación se observó en la formulación Oxidado-Q (%E = 18.78 %), la cual presentó una reducción del 60.86 % en su elongación con respecto a su contraparte sin quitosano (Oxidado, %E = 30.21 %). Estos resultados sugieren una mayor compatibilidad entre los componentes de esta formulación. Diversos autores han argumentado una posible interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, y sobre todo los grupos carboxilo de almidones oxidados y los grupos aminos protonados (NH_3^+) expuestos al solubilizar Q en ácido acético, lo cual refuerza la estructura de la película (Hu *et al.*, 2009; Zamudio-Flores *et al.*, 2010; Nourmohammadi *et al.*, 2016). En la actualidad son pocos los reportes existentes en la literatura científica sobre el efecto que puede conferir la adición de Q en almidones modificados en formulaciones de películas; la mayoría han tratado sobre el efecto del Q en almidones nativos de fuentes convencionales o comerciales.

Propiedades antibacterianas

Las propiedades antibacterianas de las películas se evaluaron utilizando bacterias *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, además de la cuantificación de coliformes fecales, los cuales son algunos de los patógenos más importantes en la industria de los alimentos (Sun *et al.*, 2014). Estos resultados se observan en el Tabla 5 y en las Figuras 1 y 2. Todas las películas adicionadas con Q presentaron actividad antibacteriana, la cual no se observó en ausencia de este biopolímero (Tabla 5). La actividad antibacteriana fue mayor en las películas de Q, Nativo-Q y Oxidado-Q, los cuales mostraron un mayor diámetro del halo de inhibición en presencia de las tres bacterias evaluadas, siendo mayor la actividad antibacteriana contra la bacteria de *E. coli*. El método de difusión en agar es una prueba comúnmente utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de películas, sus ventajas son su relativa sencillez y rapidez para determinar cualitativamente la capacidad antimicrobiana de diferentes materiales, aunque las propiedades de superficie del agente activo pueden ser una limitante (Salleh *et al*., 2014). La presencia de halos de inhibición en películas a base de quitosano y almidón ha sido reportada previamente por Salleh *et al.* (2014), quienes no observaron zona de inhibición en películas de almidón, pero en películas a base de quitosano observaron halos contra *B. subtilis* (1.70 ± 0.12 cm) y *E. coli* (2.0 ± 0.21 cm). Posteriormente, Shariatinia y Fazli (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de películas de quitosano y su mezcla con almidón. Los resultados revelaron que las películas formuladas únicamente con quitosano (1.8 % p/p) presentaron halos de inhibición de 17.37 mm contra *E. coli* y de 19.68 mm contra *S. aureus*. Cuando se incluyó almidón en la formulación (1.3 % quitosano y 1.3 % almidón, p/p) se obtuvieron zonas de inhibición de 17.96 y 20.66 mm contra *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. En un estudio reciente, Hasan *et al*. (2020) evaluaron la actividad antimicrobiana de películas de quitosano con almidón de caña de azúcar (7/3, g quitosano/g almidón) y diferentes concentraciones de aceite de oliva extra virgen (1, 2 y 5 %) contra *E. coli* y *S. aureus*. Estos autores observaron la mayor capacidad antimicrobiana en su película control (películas a base de quitosano y almidón sin aceite) con halos de inhibición de hasta 8 mm. La capacidad antimicrobiana del quitosano se ha relacionado con la protonación de los grupos amino cuando se disuelve en medio ácido, los cuales interactúan con la membrana celular de las bacterias y terminan desestabilizándola provocando la muerte de las células, particularmente en bacterias gram negativas. Aunque en estos trabajos se observaron zonas de inhibición por la presencia de quitosano en las películas, no queda claro el mecanismo bajo el cual se generan los halos de inhibición. Por otra parte, existen resultados contradictorios con reportes donde se incorporó quitosano en la formulación de las películas y no observaron halos de inhibición, pero si se observó la ausencia de crecimiento microbiano en el área en contacto directo con la película; por lo que algunos autores concluyen que no existe difusión del

Tabla 5. Actividad antibacterial de películas evaluadas en tres bacterias diferentes determinadas por la técnica de difusión en agar*.
Table 5. Antibacterial activity of films evaluated on three different bacteria determined by the agar diffusion technique*.

Película	Zona de inhibición (mm)*		
	E. coli	***S. aureus***	***L. monocytogenes***
Almidón nativo	NP	NP	NP
Autoclave	NP	NP	NP
Lintnerizado	NP	NP	NP
Entrecruzado	NP	NP	NP
Acetilado	NP	NP	NP
Hidroxipropilado	NP	NP	NP
Oxidado	NP	NP	NP
Quitosano (Q)	1.88 ± 0.01^{e}	1.27 ± 0.01^{c}	0.80 ± 0.05^{c}
Nativo-Q	1.18 ± 0.01^{d}	0.91 ± 0.01^{b}	0.85 ± 0.04^{d}
Autoclave-Q	0.98 ± 0.01^{c}	0.78 ± 0.02^{a}	0.50 ± 0.01^{b}
Lintnerizado-Q	0.88 ± 0.02^{b}	0.80 ± 0.01^{a}	0.53 ± 0.02^{b}
Entrecruzado-Q	0.79 ± 0.01^{a}	0.79 ± 0.02^{a}	0.41 ± 0.08^{a}
Acetilado-Q	0.79 ± 0.01^{a}	0.80 ± 0.02^{a}	0.40 ± 0.05^{a}
Hidroxipropilado-Q	0.85 ± 0.03^{b}	0.82 ± 0.01^{a}	0.45 ± 0.01^{a}
Oxidado-Q	2.12 ± 0.02^{f}	1.70 ± 0.02^{d}	1.08 ± 0.06^{e}

*Media aritmética de tres repeticiones ± error estándar, midiendo el halo de inhibición. Promedios dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$). NP = No presentó actividad antibacteriana.
*Arithmetic mean of three repetitions ± standard error, measuring the inhibition halo. Means within each column are not significantly different ($P > 0.05$). NP = It did not present antibacterial activity.

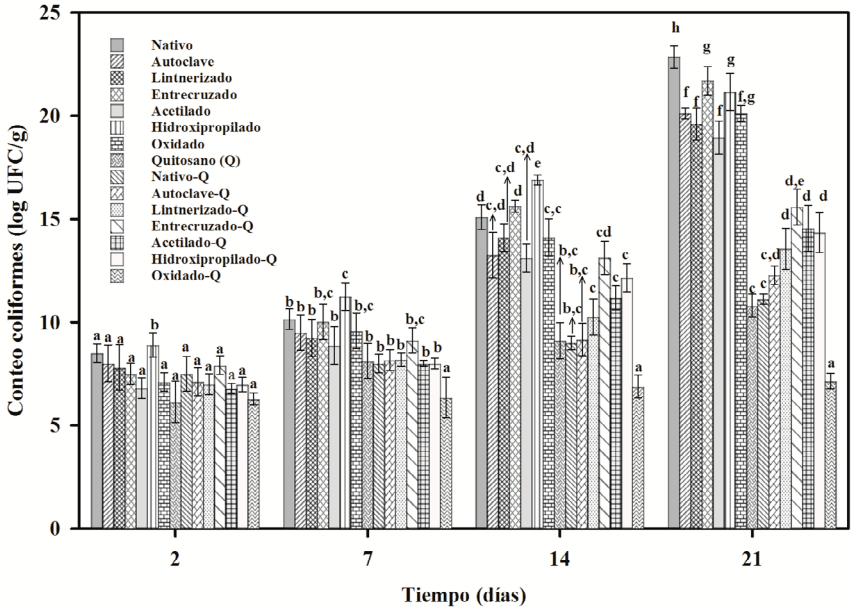


Figura 1. Conteo de coliformes fecales en muestras de carne de puerco con las diversas formulaciones de películas.
Figure 1. Fecal coliform count in pork meat samples with the various film formulations.

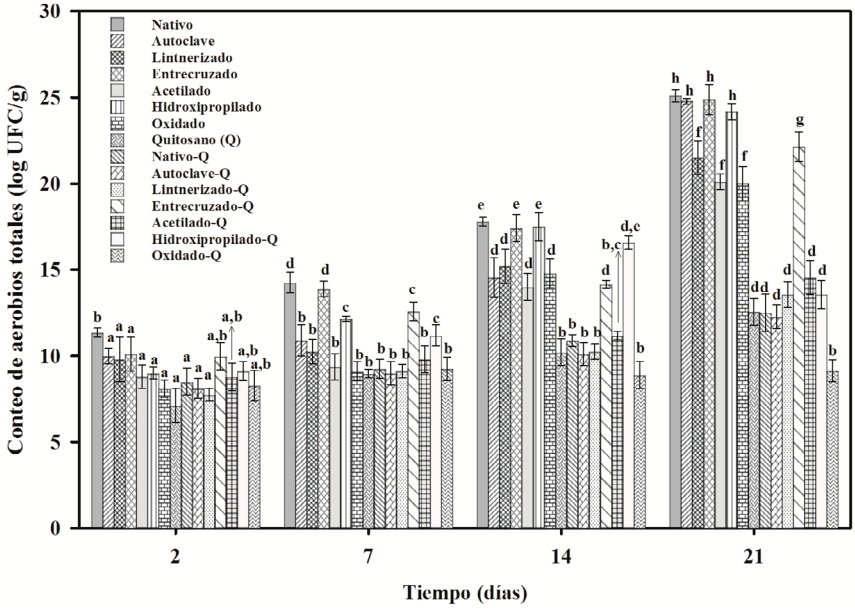


Figura 2. Conteo de aerobios totales en muestras de carne de puerco las diversas formulaciones de películas.
Figure 2. Total aerobic count in pork meat samples for the various film formulations.

quitosano y su actividad antimicrobiana se hace presente solamente cuando la película está en contacto directo con los microorganismos (Tripathi *et al*., 2009; Luchese *et al*., 2018; Zheng et al., 2019; Shapi'i *et al*., 2020). Además, el tipo de ácido utilizado para disolver el quitosano puede afectar esta actividad biológica del quitosano y sus películas. Al respecto, Zhong *et al*. (2011) prepararon películas a partir de la mezcla de soluciones filmogénicas almidón de kudzu (*Pueraria lobata*) al 2 % (p/v) y quitosano 2 % (p/v) disuelto en ácido acético, málico o láctico. Los autores evaluaron la capacidad antimicrobiana de las películas contra *E. coli* y *S. aureus*¸ la zona de inhibición para *E. coli* fue de 7.63 a 25.11 mm^2 y de 5.59 a 18.81 mm^2 para *S. aureus*. Los autores sugieren que la cantidad de grupos -NH_2 que pueden ser protonados (-NH_3^+) depende en gran medida de los valores de pH ácidos, por lo que cuando se utilizó ácido málico (el ácido más fuerte de los tres evaluados) existió una mayor presencia de grupos -NH_3^+, por lo que estas películas presentaron mayor capacidad antimicrobiana. Aunado a lo anterior, resulta interesante que después de realizar la prueba de solubilidad en las películas, el estudio de FTIR evidenció que más ácido y grupos amino protonizados pueden liberarse de las películas hacia el me-

dio. Quizás este fenómeno podría explicar la presencia de halos de inhibición en nuestro estudio, ya que al igual que en las pruebas de solubilidad reportadas por Zhong *et al.* (2011), aunque con menor intensidad, las películas de quitosano con almidón que evaluamos absorbieron humedad y posteriormente se hincharon modificando su integridad, lo que pudo provocar la liberación de ácido y pequeñas cantidades de grupos -NH_3^+ al medio, dando como resultado los pequeños halos de inhibición reportados en la Tabla 5. Este fenómeno probablemente se favoreció por la presencia de un almidón con mayor porcentaje solubilidad (almidón oxidado) en la formulación. Además, se debe señalar que existen diferencias cuando se aplica el método de difusión en medio sólido (cualitativo) y el método de cultivo líquido (cuantitativo), siendo este último el que brinda mayor información (Zhong *et al*., 2011). La solubilidad y difusión del quitosano también puede verse favorecida cuando el peso molecular es menor (Xie *et al*., 2007). Por lo anterior, estos resultados se pueden considerar como preliminares por lo que para futuras investigaciones con estos materiales se recomienda también se valore la actividad antimicrobiana por medios cuantitativos con un control de referencia.

La funcionalidad de las películas como envase activo para alimentos fue evaluada en la conservación de carne molida de cerdo. La Figura 1 muestra el conteo de coliformes totales en carne de puerco con las diferentes formulaciones de las películas a través del tiempo. En los primeros 7 d no se apreciaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. Sin embargo, a los días 14 y 21 se observa una clara disminución en el conteo de coliformes en las formulaciones adicionadas con Q. Estos resultados eran esperados, y están en concordancia con los resultados de las pruebas *in vitro* (Tabla 5), donde la película Oxidado-Q presentó la mayor actividad antimicrobiana. Estos resultados fueron similares a los reportados por Valencia-Sullca *et al.* (2018), quienes evaluaron la efectividad de películas de quitosano, almidón nativo de tapioca y sus mezclas con aceites esenciales de orégano o canela para controlar el crecimiento bacteriano en carne molida de cerdo. Los autores reportaron que, comparadas con el control (carne sin película) y la película de almidón; las películas formadas por la mezcla de quitosano y almidón o con incorporación aceites esenciales, registraron menor cuenta de coliformes y aerobios totales durante los diferentes días de muestreo (1, 4 y 7 d a 10 °C). La mayor efectividad para controlar el crecimiento microbiano la presentó la película formada únicamente por quitosano, incluso por encima de su mezcla con aceites esenciales; lo cual pudo deberse a la pérdida de aceite esencial durante el moldeo por compresión a 100 °C para elaborar las películas. En otro estudio, Fang *et al*. (2018) evaluaron el efecto de un recubrimiento de quitosano (2 %, p/p) sobre la calidad de carne fresca de cerdo envasada en atmosfera modificada (MAP) compuesta de 80 % O_2 y 20 % CO_2 y almacenada a 4 °C. Estos autores observaron que la cuenta total viable (CTV) de microorganismos al inicio del experimento fue de 2.5 log ufc/g para las muestras control (carne sin recubrimiento) y las muestras con recubrimiento. Sin embargo, al término del estudio (20 días), la CTV fue de 6.39 y 5.16 log ufc/g para las muestras control y los tratamientos con recubrimiento, respectivamente. Además, la efectividad para inhibir el crecimiento microbiano de los recubrimientos de quitosano incrementó con la inclusión de ácido gálico en la formulación. En un estudio similar, Cao *et al*. (2019) evaluaron el efecto de un recubrimiento a base de quitosano (2 % p/p) sobre la calidad de lomo de cerdo envasado en MAP (80 % O_2 y 20 % CO_2) almacenados a 2 °C. Estos autores observaron que, en comparación con el control, el recubrimiento con quitosano presentó menor crecimiento bacteriano. La actividad antimicrobiana fue mayor cuando se incluyó ácido gálico (0.2 %, p/p) y nisina (0.2 %, p/p) en la formulación, demostrando un efecto sinérgico de ambos aditivos. En un estudio reciente, se reportaron resultaron similares por Xiong *et al.* (2020), quienes almacenaron carne de cerdo durante 20 d a 4 °C y observaron que, comparado con el tratamiento control (muestras sin recubrimiento), las muestras cubiertas con películas de quitosano presentaron una CTV menor desde el día 5.

Las películas con almidón y quitosano también han sido aplicadas en carne de res, como lo reportan Mehdizadeh *et al*. (2020). Estos autores evaluaron el efecto de películas a base de mezclas de almidón y quitosano sobre la vida de anaquel de carne de res refrigerada (4 °C) durante 21 d. Se observó que el tratamiento control (carne sin película) presentó una CTV superior a 8 log CFU/g desde el día 4; mientras que en la carne envuelta en la película de quitosano con almidón, la CVT se mantuvo por debajo de dicho valor hasta el día 16, y las películas de almidón/quitosano con la adición de extractos de piel de granada presentaron valores en CVT inferiores a 8 log CFU/g durante todo el experimento. La actividad antimicrobiana del Q, principalmente contra bacterias, y en menor grado contra hongos y levaduras ha sido previamente reportada (Bonilla *et al.*, 2013). Dentro de las propiedades antimicrobianas que presenta el Q, se ha reportado que los grupos aminos con carga positiva interactúan con los grupos funcionales con carga negativa localizados en las membranas celulares de los microorganismos, permitiendo la adherencia de las partículas de quitosano al exterior de la membrana de los microorganismos, destruyendo su función de barrera (García *et al.*, 2017).

Por otra parte, la efectividad de las películas de quitosano para controlar el crecimiento microbiano en carne y otros productos puede deberse al contacto directo de la matriz polimérica con el alimento y la solubilidad de la matriz, como se describió en los resultados del ensayo por difusión en placa.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que las diferentes modificaciones químicas del almidón de avena afectan las propiedades físicas, mecánicas y de barrera de las películas obtenidas. En el caso de la luminosidad, esta se favoreció solamente por el proceso de oxidación; por lo que estas películas podrían ser consideradas cuando se desea un envase con menor opacidad. Se observó una mayor compatibilidad

entre el quitosano (Q) y el almidón oxidado debido a las interacciones químicas entre ambos, lo que repercutió en la obtención de películas con mayor tensión a la fractura y menor porcentaje de elongación. Una de las principales desventajas de las películas a base de almidón es su elevada permeabilidad al vapor de agua (PVA), con la adición de Q se establecieron interacciones entre los grupos hidroxilos del almidón y los grupos aminos del quitosano, reduciendo así la disponibilidad de grupo afines al agua reduciendo la PVA y solubilidad de las películas. Además, con la incorporación de Q, todas las formulaciones presentaron actividad antibacteriana; sin embargo, esta propiedad disminuyó con el tiempo. Las formulaciones con Q presentaron actividad antimicrobiana al momento de evaluarse como envases para carne fresca de cerdo (bajo condiciones de refrigeración). En general, los resultados indicaron que la película Oxidado-Q puede representar una formulación con propiedades mecánicas, de permeabilidad al vapor de agua y con propiedades antibacterianas adecuadas para utilizarse en productos cárnicos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Ing. Ana Karen Hernández Jiménez y al Ing. Arturo Ramos Martínez por sus asistencias técnicas. Este trabajo es un producto del Grupo de Investigación (GI) en Carbohidratos, Empaques y Alimentos Funcionales (CEAF) del CIAD-Cuauhtémoc, Chihuahua, México, liderado por el Dr. Paul Baruk Zamudio Flores.

REFERENCIAS

Arijaje, E.O., Wang, Y.-J., Shinn, S., Shah, U. y Proctor, A. 2014. Effects of chemical and enzymatic modifications on starch–stearic acid complex formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62(13): 2963-2972.

ASTM-882-95a. 1995. American Society of Testing Materials. ASTM International. West Conshohocken, PA, USA.

ASTM-D3985-05. 2010. American Society of Testing Materials. ASTM International. West Conshohocken, PA, USA.

ASTM-E96-80. 2016. American Society of Testing Materials. ASTM International. West Conshohocken, PA, USA.

Basiak, E., Lenart, A. y Debeaufort, F. 2017. Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch–whey protein blend edible films. Journal of the Science of Food and Agriculture. 97(3): 858-867.

Berry, C.S. 1986. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. Journal of Cereal Science. 4(4): 301-314.

Biduski, B., Silva, F.T.d., Silva, W.M.d., Halal, S.L.d.M.E., Pinto, V.Z., Dias, A.R.G. y Zavareze, E.d.R. 2017. Impact of acid and oxidative modifications, single or dual, of sorghum starch on biodegradable films. Food Chemistry. 214: 53-60.

Bof, M.J., Bordagaray, V.C., Locaso, D.E. y García, M.A. 2015. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. Food Hydrocolloids. 51: 281-294.

Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. y Chiralt, A. 2013. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. Journal of Food Engineering. 114(3): 303-312.

Cao, Y., Warner, R.D. y Fang, Z. 2019. Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging. Food Control. 101: 9-16.

Chattopadhyay, S., Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 1997. Optimisation of conditions of synthesis of oxidised starch from corn and amaranth for use in film-forming applications. Carbohydrate Polymers. 34(4): 203-212.

Chávez-Murillo, C.E., Wang, Y.-J. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Morphological, physicochemical and structural characteristics of oxidized barley and corn starches. Starch - Stärke. 60(11): 634-645.

Cheng, W., Chen, J., Liu, D., Ye, X. y Ke, F. 2010. Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films. Carbohydrate Polymers. 81(3): 707-711.

Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. y Del Nobile, M.A. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. Journal of Food Engineering. 88(2): 159-168.

Dang, K.M. y Yoksan, R. 2015. Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. Carbohydrate Polymers. 115: 575-581.

Dang, K.M. y Yoksan, R. 2016. Morphological characteristics and barrier properties of thermoplastic starch/chitosan blown film. Carbohydrate Polymers. 150: 40-47.

Das, D.K., Dutta, H. y Mahanta, C.L. 2013. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. LWT - Food Science and Technology. 50(1): 272-278.

Delville, J., Joly, C., Dole, P. y Bliard, C. 2003. Influence of photocrosslinking on the retrogradation of wheat starch based films. Carbohydrate Polymers. 53(4): 373-381.

El Halal, S.L.M., Colussi, R., Deon, V.G., Pinto, V.Z., Villanova, F.A., Carreño, N.L.V., Dias, A.R.G. y Zavareze, E.d.R. 2015. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. Carbohydrate Polymers. 133: 644-653.

Famá, L., Goyanes, S. y Gerschenson, L. 2007. Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. Carbohydrate Polymers. 70(3): 265-273.

Fang, Z., Lin, D., Warner, R.D. y Ha, M. 2018. Effect of gallic acid/chitosan coating on fresh pork quality in modified atmosphere packaging. Food Chemistry. 260: 90-96.

Fonseca, L.M., Gonçalves, J.R., El Halal, S.L.M., Pinto, V.Z., Dias, A.R.G., Jacques, A.C. y Zavareze, E.d.R. 2015. Oxidation of potato starch with different sodium hypochlorite concentrations and its effect on biodegradable films. LWT - Food Science and Technology. 60(2, Part 1): 714-720.

Fox, E., Shotton, K. y Ulrich, C. 1995. Sigma-Stat: Manual del usuario, versión 2.1 para Windows 95 NT y 3.1. Editorial Jandel Scientific Co. EUA.

Galdeano, M.C., Wilhelm, A.E., Grossmann, M.V.E. y Mali, S. 2014. Effect of processing and enviromental conditions in the properties of oat starch biodegradable materials. Polímeros. 24(1): 80-87.

García-Tejeda, Y.V., López-González, C., Pérez-Orozco, J.P., Rendón-Villalobos, R., Jiménez-Pérez, A., Flores-Huicochea, E., Solorza-Feria, J. y Bastida, C.A. 2013. Physicochemical and mechanical properties of extruded laminates from native and oxidized banana starch during storage. LWT - Food Science and Technology. 54(2): 447-455.

García, M.R.C., Posligua, V.G.E., Mantuano, M.H.L., Basurto, R.M., Montes, Y.M.G. y Delgado, E.G.L. 2017. Recubrimiento comestible de quitosano, almidón de yuca y aceite esencial de canela para conservar pera (*Pyrus communis* L. cv."Bosc"). La Técnica: Revista de las Agrociencias. ISSN 2477-8982. 2: 42-53.

Hasan, M., Rusman, R., Khaldun, I., Ardana, L., Mudatsir, M. y Fansuri, H. 2020. Active edible sugar palm starch-chitosan films carrying extra virgin olive oil: Barrier, thermo-mechanical, antioxidant, and antimicrobial properties. International Journal of Biological Macromolecules. 163: 766-775.

Hernandez-Izquierdo, V.M. y Krochta, J.M. 2008. Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. Journal of Food Science. 73(2): R30-R39.

Hu, G., Chen, J. y Gao, J. 2009. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. Carbohydrate Polymers. 76(2): 291-298.

Jiménez-Regalado, E.J., Caicedo, C., Fonseca-García, A., Rivera-Vallejo, C.C. y Aguirre-Loredo, R.Y. 2021. Preparation and physicochemical properties of modified corn starch-chitosan biodegradable films. Polymers, 13: 4431.

Kuakpetoon, D. y Wang, Y.-J. 2001. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. Starch - Stärke. 53(5): 211-218.

Lago-Vanzela, E.S., do Nascimento, P., Fontes, E.A.F., Mauro, M.A. y Kimura, M. 2013. Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. LWT - Food Science and Technology. 50(2): 420-425.

Laohakunjit, N. y Noomhorm, A. 2004. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. Starch - Stärke. 56(8): 348-356.

Liu, J., Wang, B., Lin, L., Zhang, J., Liu, W., Xie, J. y Ding, Y. 2014. Functional, physicochemical properties and structure of cross-linked oxidized maize starch. Food Hydrocolloids. 36: 45-52.

López-Díaz, A.S., Ríos-Corripio, M.A., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A. y Palou, E. 2018. Efecto de la radiación ultravioleta de onda corta sobre algunas propiedades de películas comestibles elaboradas con jugo de granada y quitosano. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 17(1): 63-73.

López-Mata, M.A., García-González, G., Valbuena-Gregorio, E., Ruiz-Cruz, S., Zamudio-Flores, P.B., Burruel-Ibarra, S.E., Morales-Figueroa, G.G. y Quihui-Cota, L. 2016. Development and characteristics of biodegradable Aloe-gel/egg white films. Journal of Applied Polymer Science. 133(40).

Lopez, O., Garcia, M.A., Villar, M.A., Gentili, A., Rodriguez, M.S. y Albertengo, L. 2014. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. LWT - Food Science and Technology. 57(1): 106-115.

López, O.V., García, M.A. y Zaritzky, N.E. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. Carbohydrate Polymers. 73(4): 573-581.

López, O.V., Zaritzky, N.E. y García, M.A. 2010. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. Journal of Food Engineering. 100(1): 160-168.

Luchese, C.L., Pavoni, J.M.F., dos Santos, N.Z., Quines, L.K., Pollo, L.D., Spada, J.C. y Tessaro, I.C. 2018. Effect of chitosan addition on the properties of films prepared with corn and cassava starches. Journal of Food Science and Technology. 55(8): 2963-2973.

Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. 2006. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. Journal of Food Engineering. 75(4): 453-460.

Mali, S., Sakanaka, L.S., Yamashita, F. y Grossmann, M.V.E. 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. Carbohydrate Polymers. 60(3): 283-289.

Martinez-Alvarenga, M.S., Martinez-Rodriguez, E.Y., Garcia-Amezquita, L.E., Olivas, G.I., Zamudio-Flores, P.B., Acosta-Muniz, C.H. y Sepulveda, D.R. 2014. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – Maltodextrin conjugates. Food Hydrocolloids. 38: 110-118.

McHugh, T. y Krochta, J.M.1994. Edible coatings and films to improve food quality. En*:* Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. J. M. Krochta, E. A. Baldwin y M. O. Nisperos-Carriedo (eds.). pp. 139-187. Technomic Publishing Company. Lancaster, Pennsylvania, USA.

Mehdizadeh, T., Tajik, H., Langroodi, A.M., Molaei, R. y Mahmoudian, A. 2020. Chitosan-starch film containing pomegranate peel extract and *Thymus kotschyanus* essential oil can prolong the shelf life of beef. Meat Science. 163: 108073.

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y. y Li, Y. 2013. Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. International Journal of Biological Macromolecules. 57: 17-21.

Mendes, J.F., Paschoalin, R.T., Carmona, V.B., Sena Neto, A.R., Marques, A.C.P., Marconcini, J.M., Mattoso, L.H.C., Medeiros, E.S. y Oliveira, J.E. 2016. Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. Carbohydrate Polymers. 137: 452-458.

Nourmohammadi, J., Ghaee, A. y Liavali, S.H. 2016. Preparation and characterization of bioactive composite scaffolds from polycaprolactone nanofibers-chitosan-oxidized starch for bone regeneration. Carbohydrate Polymers. 138: 172-179.

Osundahunsi, O.F., Seidu, K.T. y Mueller, R. 2014. Effect of presence of sulphurdioxide on acetylation and sorption isotherm of acetylated starches from cultivars of cassava. Food Chemistry. 151: 168-174.

Ozdemir, M. y Floros, J.D. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. Journal of Food Engineering. 84(1): 116-123.

Palma-Rodríguez, H.M., Aguirre-Álvarez, G., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A.I., Bello-Pérez, L.A. y Vargas-Torres, A. 2012. Oxidized banana starch–polyvinyl alcohol film: Partial characterization. Starch - Stärke. 64(11): 882-889.

Pérez-Gallardo, A., Bello-Pérez, L.A., García-Almendárez, B., Montejano-Gaitán, G., Barbosa-Cánovas, G. y Regalado, C. 2012. Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability, solubility, and opacity of films. Starch - Stärke. 64(1): 27-36.

Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O. y McHugh, T.H. 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(24): 9262-9267.

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A. y Fernández-López, J. 2013. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated

with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. Food Control. 30(2): 386-392.

Rutenberg, M.W. y Solarek, D.1984. Starch derivatives: production and uses. En*:* Starch: Chemistry and Technology. R. L. Whistler, J. N. Bemiller y E. F. Paschall (eds.). 2 ed**.,** pp. 311-388. Academic Press. San Diego, USA.

Salleh, E., Muhammad, I.I. y Pahlawi, Q.A. 2014. Spectrum Activity and Lauric Acid Release Behaviour of Antimicrobial Starch-based Film. Procedia Chemistry. 9: 11-22.

Sánchez-Rivera, M.M., García-Suárez, F.J.L., Velázquez del Valle, M., Gutierrez-Meraz, F. y Bello-Pérez, L.A. 2005. Partial characterization of banana starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. Carbohydrate Polymers. 62(1): 50-56.

Seib, P.A. y Woo, K. 1999. Food grade starch resistant to α-amylase and method of preparing the same. U. S. patent 5,855,946 A.

Shapi'i, R.A., Othman, S.H., Nordin, N., Kadir Basha, R. y Nazli Naim, M. 2020. Antimicrobial properties of starch films incorporated with chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. Carbohydrate Polymers. 230: 115602.

Shariatinia, Z. y Fazli, M. 2015. Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. Food Hydrocolloids. 46: 112-124.

Shen, X.L., Wu, J.M., Chen, Y. y Zhao, G. 2010. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. Food Hydrocolloids. 24(4): 285-290.

Shin, M., Woo, K. y Seib, P.A. 2003. Hot-water solubilities and water sorptions of resistant starches at 25°c. Cereal Chemistry. 80(5): 564-566.

Singh, B. y Sharma, N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. Polymer Degradation and Stability. 93(3): 561-584.

Smith, R.J.1967. Production and use of hypochlorite oxidized starches. En*:* Starch Chemistry and Technology. Vol. 2. R. L. Whistler y E. F. Paschall (eds.). pp. 620-625. Academic Press. New York, USA.

Souza, V.G.L., Fernando, A.L., Pires, J.R.A., Rodrigues, P.F., Lopes, A.A.S. y Fernandes, F.M.B. 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. Industrial Crops and Products. 107: 565-572.

Steffe, J.F. 1996. Rheological Methods in Food Process Engineering. Freeman press. East Lancing. Michigan.

Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H. y Zhou, K. 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan–gallic acid films. LWT - Food Science and Technology. 57(1): 83-89.

Teodoro, A.P., Mali, S., Romero, N. y de Carvalho, G.M. 2015. Cassava starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: physical and mechanical characterization. Carbohydrate Polymers. 126: 9-16.

Tirado-Gallegos, J.M., Zamudio-Flores, P.B., Ornelas-Paz, J.d.J., Rios-Velasco, C., Olivas Orozco, G.I., Espino-Díaz, M., Baeza-Jiménez, R., Buenrostro-Figueroa, J.J., Aguilar-González, M.A., Lardizábal-Gutiérrez, D., Hernández-González, M., Hernández-Centeno, F. y López-De la Peña, H.Y. 2018. Elaboration and characterization of active apple starch films incorporated with ellagic acid. Coatings. 8(11): 384.

Tripathi, S., Mehrotra, G.K. y Dutta, P.K. 2009. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. International Journal of Biological Macromolecules. 45(4): 372-376.

Valencia-Sullca, C., Vargas, M., Atarés, L. y Chiralt, A. 2018. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. Food Hydrocolloids. 75: 107-115.

Walpole, E.R., Myers, H.R. y Myers, L.S. 1999. Probabilidad y estadística para ingenieros. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A. México.

Wang, Y.-J. y Wang, L. 2002. Characterization of acetylated waxy maize starches prepared under catalysis by different alkali and alkaline-earth hydroxides. Starch - Stärke. 54(1): 25-30.

Wu, H., Liu, C., Chen, J., Chen, Y., Anderson, D.P. y Chang, P.R. 2010. Oxidized pea starch/chitosan composite films: Structural characterization and properties. Journal of applied polymer science. 118(5): 3082-3088.

Wu, Y., Geng, F., Chang, P.R., Yu, J. y Ma, X. 2009. Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. Carbohydrate Polymers. 76(2): 299-304.

Wurzburg, O.B.1986. Converted starches. En*:* Modified Starches: Properties and Uses. O. B. Wurzburg (ed.). pp. 17–40. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

Xie, Y., Liu, X. y Chen, Q. 2007. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. Carbohydrate polymers, 69(1): 142-147.

Xiong, Y., Chen, M., Warner, R.D. y Fang, Z. 2020. Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatine edible coating and its effect on cold storage of fresh pork. Food Control. 110: 107018.

Zamudio-Flores, P.B. y Bello-Pérez, L.A. 2013. Elaboración y caracterización de películas de glicoproteínas obtenidas mediante reacción de Maillard utilizando almidón acetilado y aislado proteico de suero lácteo. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 12(3): 401-413.

Zamudio-Flores, P.B., Ochoa-Reyes, E., Ornelas-Paz, J.d.J., Tirado-Gallegos, J.M., Bello-Pérez, L.A., Rubio-Rios, A. y Cárdenas-Félix, R.G. 2015. Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de películas de almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas. Agrociencia. 49: 483-498.

Zamudio-Flores, P.B., Torres, A.V., Salgado-Delgado, R. y Bello-Pérez, L.A. 2010. Influence of the oxidation and acetylation of banana starch on the mechanical and water barrier properties of modified starch and modified starch/chitosan blend films. Journal of Applied Polymer Science. 115(2): 991-998.

Zamudio-Flores, P.B., Vargas-Torres, A., Pérez-González, J., Bosquez-Molina, E. y Bello-Pérez, L.A. 2006. Films prepared with oxidized banana starch: Mechanical and barrier properties. Starch - Stärke. 58(6): 274-282.

Zavareze, E.d.R., Pinto, V.Z., Klein, B., El Halal, S.L.M., Elias, M.C., Prentice-Hernández, C. y Dias, A.R.G. 2012. Development of oxidised and heat–moisture treated potato starch film. Food Chemistry. 132(1): 344-350.

Zheng, K., Xiao, S., Li, W., Wang, W., Chen, H., Yang, F. y Qin, C. 2019. Chitosan-acorn starch-eugenol edible film: Physico-chemical, barrier, antimicrobial, antioxidant and structural properties. International Journal of Biological Macromolecules. 135: 344-352.

Zhong, Y., Song, X. y Li, Y. 2011. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. Carbohydrate Polymers. 84(1): 335-342.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Bionomic modelling of hyperstable fish populations. The gulf corvina, *Cynoscion othonopterus*, fishery as case study

Modelización bionómica de poblaciones de peces hiperestables. La pesquería de curvina golfina, *Cynoscion othonopterus*, como estudio de caso

Ricardo Urías-Sotomayor[1,2], Eugenio A. Aragón-Noriega[1], Jorge Payán-Alejo[2], Miguel Á. Cisneros-Mata[3]*, Guillermo Rodríguez-Domínguez[2]

[1] Unidad Guaymas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Km 2.35 Camino al Tular, Estero de Bacochibampo, Guaymas, Sonora 85454, México.
[2] Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Paseo Claussen S/N, Mazatlán, Sinaloa 82000, México.
[3] Instituto Mexicano de Investigación en Pesca y Acuacultura Sustentables. Calle 20 No. 605-Sur. Guaymas, Sonora 85400, México.

ABSTRACT

Catch and fishing effort data are generally available, hence surplus production models are commonly used to conduct assessments. However, hyperstability resulting from spawning aggregations (SA) pose challenges to determine status and inform management of many fisheries resources. Using data from 1991 to 2019, we develop a method to study hyperstable fished stocks relaxing the assumption of constant catchability, hence direct dependence of catch-per-unit-effort and biomass. Information criterion was used to choose the best model including a Cobb-Douglas function for gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*), a sciaenid fish endemic to the gulf of California, managed through annual quotas. Bionomic stock-reduction models were fit using catch, effort, published natural mortality, virgin biomass, and economic structure. Models were solved using maximum likelihood and the best model chosen with Akaike information criterion. Current fishing effort is beyond bionomic optimum. This deserves a precautionary approach to protect this endemic species and sustain the fishery.

Key words: hyperstability, Cobb-Douglas, stock reduction, gulf corvina

RESUMEN

Generalmente se disponen de datos de captura y esfuerzo para evaluar stocks usando modelos de producción excedente. Sin embargo, la hiperestabilidad resultante de agregaciones de desove (AD) genera retos en muchos recursos pesqueros; entonces se recomienda usar funciones de producción no lineal. Utilizando datos de 1991 a 2019, desarrollamos un método para evaluar pesquerías de recursos hiperestables, relajando el supuesto de capturabilidad constante y dependencia directa de captura-por-unidad-de-esfuerzo y biomasa. Usamos criterios de información para determinar el mejor modelo usando una función Cobb-Douglas. Ejemplificamos con la pesquería de corvina "golfina" (*Cynoscion othonopterus*), un pez endémico al golfo de California con un sistema de cuotas anuales. Los modelos bionómicos se ajustaron utilizando captura y esfuerzo anuales, tasas de mortalidad natural, biomasa virgen y estructura económica. Ajustando por máxima verosimilitud, el mejor modelo se eligió con el criterio de Akaike. El esfuerzo de pesca actual sobrepasa el óptimo bionómico. Esto implica adoptar enfoques precautorios para proteger esta especie endémica y sostener la pesquería.

Palabras clave: hiperestabilidad, Cobb-Douglas, reducción de stock, corvina del golfo.

INTRODUCTION

Sound assessments of fishing resources are critical for management (Melnychuk *et al*., 2017). However, a pervasive challenge is scarcity of data (Hilborn *et al*., 2020). Often, catch-effort series are used to fit models because catch-per-unit-effort (CPUE) indicates abundance, despite caveats (Harley *et al*., 2001; Haggarty and King, 2006). However, CPUE may remain high even if abundance decreased; this is known as hyperstability and typically happens when dioecius fish aggregate to reproduce (Erisman *et al*., 2011).

The gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) is a marine fish endemic to the gulf of California (henceforth, the gulf), commercially fished within a biosphere reserve under an annual quota regime. Assessing this species remains a challenge because it does not lend itself to standard assessments due to hyperstability, that results in spawning aggregations which increases its vulnerability to fishing. This might indeed be resulting in biased estimates, crucial to allocate quotas.

From January to May, corvina forms spawning aggregations (SA) in shallow (< 50 m) waters at the upper gulf, resulting in increased vulnerability to fishing. Over 4,000 ton per year are taken by ~700 small-scale vessels. Management based on a total annual catch is done since 2012 (Mendívil-Mendoza *et al*., 2018). Corvina grows relatively fast, reaching maturity in two years (Gherard *et al*., 2013). An average female lays ~1´670,000 eggs per spawn (Román-Rodríguez, 2000; Cotero-Altamirano *et al*., 2018), associated with high productivity of the area (Gherard *et al*., 2013).

Hyperstability challenges stock assessments and management (Mackinson *et al*., 1997). A good example was the collapse of northern cod (*Gadus morhua*) stock off Newfoundland and Labrador (Rose and Kulka, 1999). One way to overcome this problem is using ancillary, fisheries-in-

*Author for correspondence: Miguel Á. Cisneros-Mata
e.mail: macisne@yahoo.com
Received: June 13, 2023
Accepted: February 19, 2024
Published: April, 1, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2065

dependent information; another desirable way to improve modelling is relaxing assumption of direct proportionality of CPUE and abundance (Ulltang, 1996; Walter and Porch, 2012). The latter can be done by replacing the production function where *Y* is yield, *q* is constant catchability, *f* is fishing effort and *B* is biomass of the fishing resource. An alternative production function (Cobb and Douglas, 1928) is (i.e., $Y/f^{\mu} = B^{\gamma}$) where μ and γ reflect relation between CPUE and abundance (Harley *et al*., 2001). When μ and γ <1, either yield is affected as effort increases, or catchability increases as biomass decreases, respectively. When both μ and γ = 1, the production function is equivalent to Schaefer's function, widely used to assess fished stocks. It is also useful to conduct stock reduction analysis (SRA) (Kimura and Tagart, 1982) which, based on annual catches, seeks to solve Baranov's catch equations system (Baranov, 1918) linked to natural mortality M, biomass, recruitment, and a biomass reduction ratios.

The gulf corvina has high economic value: flesh, swim bladder and gonads are commercialized; this strongly increases market demand. In open access (*de facto* or *de jure*) regimes, economic value can stimulate fishing effort and stock depletion to risky levels; this is particularly true for stocks, such as corvina, which form SA. In such cases, bionomic models can provide information useful for management (Pascoe *et al*., 2016). Some types of models consider age or size structure (Jensen, 1974; Schnute, 1987; Martell *et al*., 2008; Methot and Wetzel, 2013) which, in comparison to aggregated models, allow more realistic analyses, for example the influence of natural or fishery-induced variability at different ages. Such models are highly demanding in terms of data and information, while biomass-aggregated models are widely used for stock management, particularly in data poor situations (Haddon, 2011). Here, we follow an approach of information theory and test six different model scenarios, all based on the assumption of aggregated biomass. We assess the gulf corvina (henceforth, corvina) through a bionomic evaluation of its fishery using SRA with a Cobb-Douglas function (Hannesson, 1983). This allowed consideration of catchability as a function of stock biomass, hence accounting for hyperstability.

MATERIALS AND METHODS

Annual corvina catch data (1991 to 2019) were obtained from research centers (IMIPAS, CIBNOR) and effort (2013 to 2019) from Mexico's federal fishing authority (CONAPESCA) (Fig. 1). Effort is mean number of boats operating during a fishing season. Corvina beach price and effort costs were collected through interviews with fishers and by Environmental Defense Fund of Mexico (EDF). All prices refer to year 2019.

The SRA (Kimura and Tagart, 1982) was used to assess the corvina. Data consisted of annual catch series, two estimates of natural mortality rates $M = 0.26$ and $0.38 year^{-1}$ (Erisman *et al*., 2014) and virgin biomass ranging between 15,000 to 30,000 tons. SRA solves n+1 (n = # of years) simultaneous nonlinear equations for catch (C_i), biomass (B_i) and biomass depletion rate (P) observed in n years of fishing:

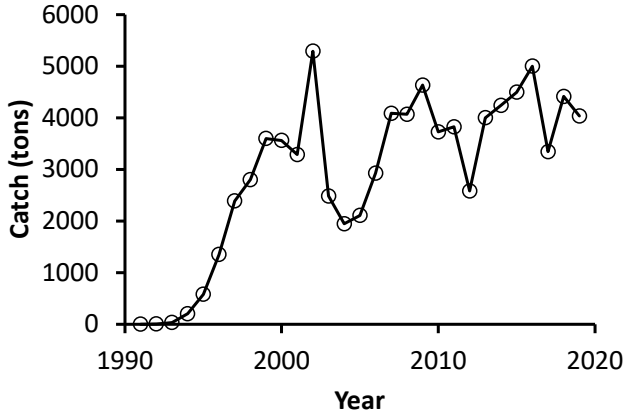


Figure 1. Catch series of *Cynoscion othonopterus* at the upper gulf of California.
Figura 1. Serie de capturas de *Cynoscion othonopterus* en el alto golfo de California.

$$C_i=(B_iF_i(1-\exp(-F_i-M_i)/(F_i+M)$$
$$B_i=B_{i-1}\exp(-F_i-M)+R$$
$$P=B_{n+1}/B_1 \quad (1)$$

where, for year i, F_i = instantaneous fishing natural mortality rate, and R=constant recruitment. We used fixed values of M, B_1 and P, and solved for R, $F_1, \ldots, F_n$ restricting solution to values of B_1 and P that intersected virgin biomass (B_1), recruitment and exploitation rate ($\bar{E}= F/(F_i+M) = 0.825$; 0.794, 0.858 95% CI) for years 2013 to 2015 (Erisman *et al*., 2014; 2020). Biomass was then projected after 2019, changing F_i to test catch quota scenarios.

For the bionomic analysis, the Cobb-Douglas function was fitted to annual biomass data (2014-2019) estimated with SRA using M = 0.26, restricted to $\bar{E}=_{2013\text{-}2015} = 0.825$, and observed catch-effort. Six production function were fitted:

Case 1) $-\infty < \mu < +\infty$ and $-\infty < \gamma < +\infty$;
Case 2) $\mu = 1$ and $-\infty < \gamma < +\infty$;
Case 3) $-\infty < \mu < +\infty$ and $\gamma = 1$;
Case 4) $\mu = 0$ and $-\infty < \gamma < +\infty$;
Case 5) $-\infty < \mu < +\infty$ and $\gamma = 0$; and
Case 6) $\mu = 1$ and $\gamma = 1$

Note that case 6 is Schaefer's model which could a priori be discarded in the case of corvina, due to hyperstability. However, it was included because in case of being a "loser" model, it should be disregarded in fisheries management decisions. Models were fitted using maximum likelihood assuming lognormal residuals; the "best" model was chosen using the Akaike criterion for small sample size (AICc) (Burnham and Anderson, 2002).

The Cobb-Douglas function was equated to biological SRA yield function and solved for f to estimate fishing effort:

$$B[e^{-F-M} - e^{-F}] + R = A * f^{\mu}B^{\gamma} \quad (2)$$

$$f_{PEC} = \left(\frac{B^{1-\gamma}[e^{-r-M} - e^{-r}] + B^{-\gamma}R}{A}\right)^{\mu} \quad (3)$$

f_{PEC} is equilibrium effort to obtain a sustainable yield, B is biomass in equilibrium.

Total income was obtained multiplying corvina beach price by sustainable biological yield; costs were estimated multiplying cost per unit effort by total effort. Total net income (πt) was obtained subtracting cost income: $\pi t = p[A * f^{\mu} B^{\gamma}] - cf$. Solving for f and equating total net income to zero, effort in economic equilibrium f_{EEC} was estimated as:

$$f_{EEC} = \left[\frac{pAB^{\gamma}}{c}\right]^{\left(\frac{1}{1-\mu}\right)} \quad (4)$$

f_{EBE} occurs when $f_{PEC} = f_{EEC}$. Effort for maximum economic yield f_{MEY} was obtained equating the income function to zero and obtaining the first derivative as a function of f:

$$f_{MEY} = \left[\frac{C}{p\mu AB^{\gamma}}\right]^{\left(\frac{1}{\mu-1}\right)} \quad (5)$$

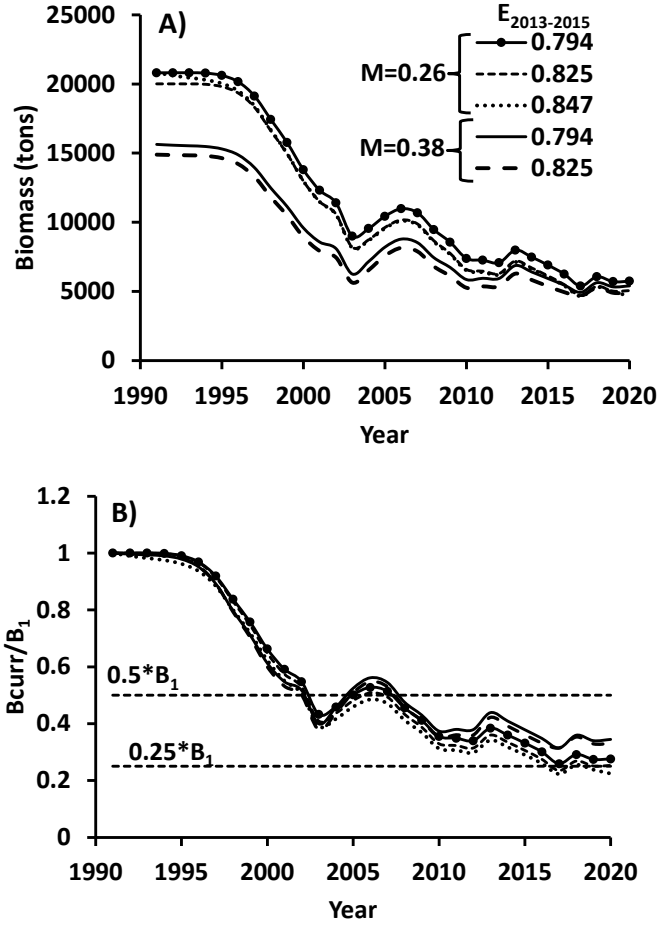


Figure 2. Total (A) and relative (B) biomass of *Cynoscion othonopterus* using SRA considering two natural mortality rates and restrictions in exploitation rates $E_{2013-2015}$.

Figura 2. Biomasa total (A) y relativa (B) de *Cynoscion othonopterus* usando SRA considerando dos tasas de mortalidad natural y restricciones en las tasas de explotación $E_{2013-2015}$.

RESULTS

Stock Reduction Analysis (SRA)

With M = 0.26 y^{-1}, solutions to the catch equation system were found for a biomass decline ratio ≥ 0.24 (Table 1) for constraint $\bar{E}_{2013-2015}$ = 0.825 and 0.794; no solutions where possible when $\bar{E}_{2013-2015}$ = 0.858. With M = 0.26 and restrictions of $\bar{E}_{2013-2015}$, solutions were found for biomass depletion ratio between 0.24-0.276; initial biomass ranged between 19,465-20,814 ton, and annual recruitment 4,444-4,768 ton. With M = 0.38, solutions were limited to biomass depletion rate between 0.330-0.345.

Table 1. Results of the SRA model for gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) considering two values of annual natural mortality rate (*M*) restricted to $\bar{E}_{2013-2015}$.
Tabla 1. Resultados del modelo SRA para curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*) considerando dos valores de tasa de mortalidad natural anual (M) restringida por $\bar{E}_{2013-2015}$.

M	P	B_1	$\bar{E}_{2013-2015}$	R
0.26	0.235		No solutions	
	0.240	19,465	0.847	4,444
	0.253	20,000	0.825	4,579
	0.276	20,814	0.794	4,768
0.38	0.250		No solutions	
	0.300		No solutions	
	0.330	14,881	0.824	4,678
	0.345	15,632	0.794	4,884

Estimates of B_1 differed for both M values (Fig. 2A). Final biomass varied slightly regardless of M: 4,500 - 5,700 tons. Current biomass relative to B_1 for both M values showed a similar pattern of decline; at the end of the series relative biomass estimates with M = 0.26 were nearly 0.25*B_1. Solutions with M = 0.38 suggest declining biomass between 0.33 - 0.345 of B_1 (Fig. 2B).

With M = 0.38 y^{-1} and both restrictions of $\bar{E}_{2013-2015}$, SRA yielded F estimates higher than with M = 0.26. However, at the end of 2019, with restrictions in either M and $\bar{E}_{2013-2015}$ resulted in F to vary between 1.5 - 2.7 (Fig. 3), higher than $F_{0.5B1,M\,0.26}$ = 0.35 or $F_{0.5B1,\,M\,0.38}$ = 0.61. F increased sharply from 2012-2016 and dropped in 2017, coinciding with decreased fishing due to a "payment for not fishing" policy implemented to which most fishers subscribed. The highest F was for 2016, when the largest catch was recorded.

Relative biomass from 2019 - 2025 using M = 0.26 y^{-1} increased under scenario of 3,000 and 3,500 tons of annual catch quota (Fig. 4A); for a 4,000 tons quota scenario, relative biomass increased less. A catch quota greater than 4,200 ton yielded a biomass depletion of 25 % B_1 by 2025. Using M = 0.38 yielded more conservative biomass depletion. Relative biomass increased with annual catch quotas ≤ 4,000 ton.

Production Function

Function # 5 was a "clear winner", having the lowest AICc and weight W_i greater than 90 % (Table 2). This function was:

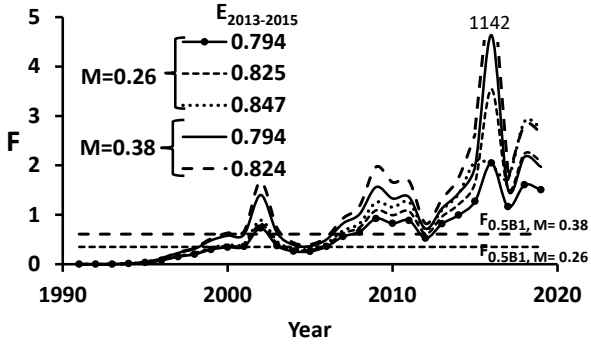


Figure 3. Estimated instantaneous fishing mortality rate of *Cynoscion othonopterus* at the upper gulf of California from 1991 to 2019. The number above the dashed line is an *F* value out of scale. Horizontal lines represent the *F* value required for a constant stock of 0.5*K* for two values of *M*.

Figure 3. Tasa instantánea de mortalidad por pesca estimada de *Cynoscion othonopterus* en el alto golfo de California desde 1991 a 2019. El número sobre la línea discontinua es un valor *F* fuera de escala. Las líneas horizontales representan el valor de *F* requerido para un stock constante de 0.5*K* para dos valores de *M*.

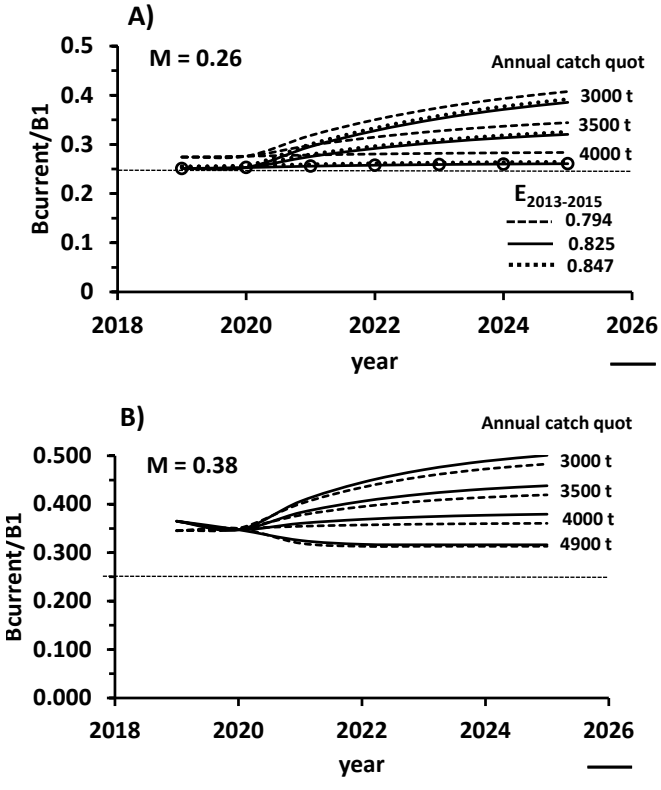


Figure 4. Projected relative biomass of gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) from 2019 to 2025 using parameter estimates of SRA and assuming different annual catch quota scenarios.

Figura 4. Biomasa relativa proyectada de curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*) de 2019 a 2025 usando estimaciones de parámetros de SRA y asumiendo diferentes escenarios de cuotas anuales de captura.

Table 2. Parameters and model selection of six Cobb-Douglas production function cases. A in case 6 is catchability *q*. Bold numbers are predetermined values. The winning model parameters are in bold in the W_i.

Tabla 2. Parámetros y selección de modelo entre seis casos de la función de producción Cobb-Douglas. A en el caso 6 es capturabilidad *q*. Los números en negritas son valores predeterminados. Los parámetros del modelo ganador están en negrita en el W_i.

Case	Parameters	A	μ	ν	AIC_c	ΔAIC_c	W_i
1	4	1,099.8	0.226	0.00000	115	20.0	0.0
2	3	1046,675.34	**1**	0.00000	158	63.6	0.0
3	3	0.49	0.073	**1**	103	7.8	2.0
4	3	31.21	**0**	0.57	102	7.1	2.8
5	3	1,099.8	0.226	**0**	95	0.0	**95.3**
6	2	0.0019	**1**	**1**	113	18.3	0.0

$$Y_t = 1{,}099.08 f_t^{0.226} \quad (6)$$

Yield is related to effort but not to stock biomass: μ = 0.226 implies existence of congested fishing effort, indicating that an increase unit effort decreases mean CPUE.

Bionomic Analysis

Price per kilogram of corvina between 2011 and 2019 was MXN 12.5 and remained almost stable during that period, mean price of gas bladder was MXN 279 per kg and fluctuated slightly, and mean price of gonad was MXN 87 per kg and showed a slight increase over time (Licón-González *et al*., 2023). The average catch per trip of a fishing boat is 1,135 kg and over 90 % of the cost structure belongs to variable costs. Out of a total of MXN 2,895 per kg, 40 % and 35 % correspond, respectively, to gasoline and gutting (EDF, 2016).

Since catch is independent of biomass, f_{PEC} and f_{EEC} do not converge, which reflects lack of bionomic equilibrium (Fig. 5). f_{EEC} constant = 2,379 fishing units, never reached equilibrium because f_{PEC} approaches 557 when biomass approaches zero. In a free access scenario, effort would grow until the corvina is exhausted, before reaching bionomic equilibrium. f_{MEY} is reached with 348 small boats (Fig. 6). A remarkable result is

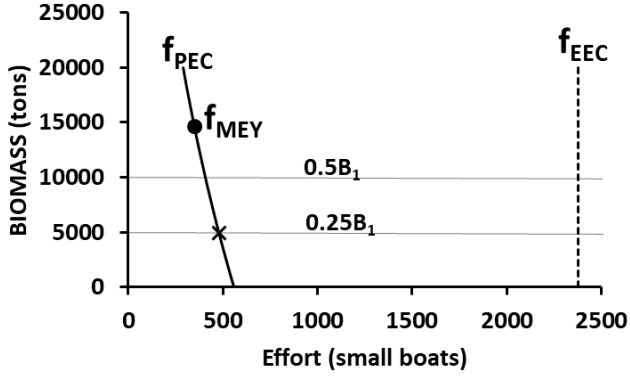


Figure 5. Population equilibrium (PEC) and economic equilibrium (EEC) curves for the gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) fishery in the upper gulf of California.

Figura 5. Curva de esfuerzo en equilibrio poblacional (PEC) y de equilibrio económico EEC para la pesquería de curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*) en el alto golfo de California.

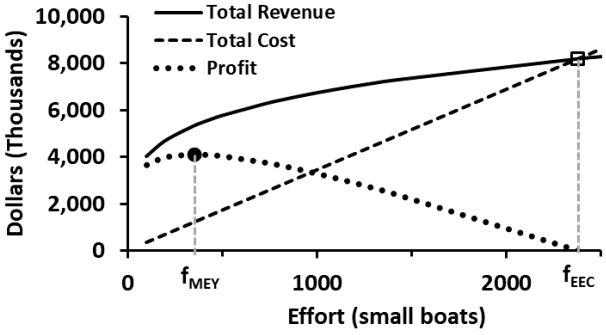


Figure 6. Total revenues and costs in the gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) fishery in the upper gulf of California.
Figura 6. Ingresos y costos totales en la pesquería de curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*) del alto golfo de California.

that f_{PEC} at $0.25B_1$ with only 477 small boats, meaning that increased fishing effort compromises sustainability of the fishery.

DISCUSSION

Despite problems of CPUE known since decades ago (Coppola and Pascoe, 1998; Maunder *et al*., 2006), surplus production models will likely continue in use because catch-effort are easy to collect (e.g., Urías-Sotomayor *et al*., 2018; Alam *et al*., 2021; Angelini *et al*., 2021; Meissa *et al*., 2021). We highlighted how assessments can be done with ancillary fishery-independent data. When fish form aggregations that increase catchability and CPUE, use of a Cobb-Douglas production function can overcome problems associated with hyperstability. For our case study, we were able to derive meaningful management information for the gulf corvina. This is important because official annual assessments use Schaefer's production function (e.g., Ruelas-Peña *et al*., 2013).

Our approach captured interannual dynamics of corvina. Fluctuations of ca. eight years seem to indicate cyclical events. Within a fishing season, tidal cycles also influence availability of corvina (Román-Rodríguez, 2000); hence mid-term cycles and lunar effects could be linked and influence corvina. The only lunar cycle with a period of 8.85 y is displacement to the east of the lunar perigee; this produces intense spring tides approximately every 4.4 y (Haigh *et al*., 2011). Such variability should be considered in modelling to inform management of corvina.

Although SRA is a deterministic procedure, using two estimates of M and an interval of 25 % and 75 % of $_{2013\text{-}2015}$ (see below) allowed to address uncertainty of assessments. B_1 estimates in this work might be considered "virgin" biomass (B_v) because initial catch represents a relatively low fishing effort. Thus, estimates of ratio of final to initial biomass means that stock biomass of corvina at the upper gulf of California is between 25 % and 34.5 % of B_v, being both lower than $0.5B_v$ estimated by Enciso-Enciso (2014).

Lower stock size is associated with M = 0.26 y^{-1} and higher wit M = 0.38 y^{-1}; thus, a good M estimate is important to assess this fishery. The two M values used in the present study were estimated by Erisman *et al*. (2014) from empirical formulas of Pauly (1980) and Jensen (1996). Both were the best of 30 formulas for assessments with limited data (Kenchington, 2014). With M = 0.26, solutions to SRA catch equations were restricted to the range of exploitation rates estimated by Erisman *et al*. (2014) for 2013 - 2015 (from 25 % to 75 %). In contrast, with M = 0.38, no solutions were possible for the entire range of $\bar{E}_{2013\text{-}2015}$ used. Solutions were only found when mean value and lowest of these exploitation rates were used. The only viable solution with M = 0.38 was found using as constraint the lowest estimated exploitation rate during the 2013 - 2015 seasons. Consequently, the value of M for this species is closer to 0.26 than 0.38 y^{-1}. Because of this, true biomass at the end of 2019 may be closer to $0.25B_v$ than $0.35B_v$.

The gulf corvina stock is in worst condition than previously estimated by Enciso-Enciso (2014) who considered to be optimal, close to $0.5B_v$. A condition of the gulf corvina between $0.25B_v$ and 0.35 B_v is of concern since the lowest has been a biomass level where all common functions of stock-recruitment predict depensation or reduced recruitment (Beverton and Holt, 1957; Ricker, 1975; Barrowman and Myers, 2000), which could be defined as limit reference point for management (Caddy and Mahon, 1996).

Our results agree with Mendívil-Mendoza *et al*. (2018): the fishery is unsustainable because it is based on mega-breeders. In other words, this fishery's profitability and continuity relies heavily on aggregated fish and therefore cannot be considered as a fishery where random distribution of fish plays a key role. Results of Erisman *et al*. (2020) coincide with ours. They estimated that yield per recruit was 73 % of maximum possible for this population. Erisman *et al*. (2014) found contradictory results regarding stock status in 2012. The low abundance of mega-spawners and an analysis of spawning potential indicated overexploitation; but increasing average corvina sizes in catches related to regulations of mesh size indicated sustainability. From 2009 to 2019, however, catch size gradually decreased at a rate of 1 cm y^{-1} (INAPESCA, 2021).

This fishery has been managed with annual quotas between 4,000 and 4,500 tons between 2015 and 2020; in 2021 this was increased to 5,128 tons. Our projections with SRA show that a < 4,000 tons quota recover the stock. Catches above 4,000 tons are only possible if M = 0.38 y^{-1} but the stock status remains close to the limit point $0.25B_v$.

The best Cobb-Douglas production function indicated that as effort increases fishers compete, reducing their overall catchabilities. The zero-exponent obtained for biomass indicates that catch is independent of abundance; it depends on effort, which supports the hypothesis of hyperstability. For the same reason, f_{PEC} and f_{EEC} do not converge, indicating absence of a bionomic equilibrium, and that under open access fishing effort can deplete the stock.

Spawning aggregations can withstand increased catch rates despite stock reduction until the fishery collapses. Although catch is independent of biomass, a reduction lower than $0.25B_1$ compromises sustainability of the stock, achieved

with a fishing effort of 477 boats. In 2019, 450 boats operated close to the limit. Currently, 737 boats possess fishing permits for gulf corvina; this threatens the fishery because all too often quotas are not enforced (Mendívil-Mendoza *et al*., 2018). Even if quotas were not exceeded, excess fishing units beyond economic optimum signifies reduced catch rates and, most likely profits, due to effort crowding.

Stimulus to increase catch follows a concomitant increase in market prices. When catches increase early in the fishing season, market saturates and price plummets. Recent interest to market gonads and crops increases income, which increase catches (EDF, 2016).

In 2016, catches concentrated in the first month of the season, saturating the market and lowering the price from $15,000.00 MXN/ton (USD 779.22) to $8,000.00 MXN/ton (USD 415.58); in the following month catches decreased by a third (EDF, 2016). This indicates that the price reduction observed in 2015 can reduce effort due to low profitability.

Our economic analysis assumed constant prices and costs; an elastic price could change these results. Market saturation in the first month causes reduction in price (EDF, 2016). However, in recent years the price of gutted product seems to follow a supply-demand relationship, but price stabilizes complementing with sale of swim bladders and gonads.

Annual quota disregards hyperstability, which can be overcome using nonlinear production functions and fisheries-independent data. With this approach, we found that the gulf corvina biomass is close to 25 % of virgin stock, which calls for precautionary management to avoid economic collapse to the fishery and reduced viability of this species. Quotas need be precautionary strict enforcement is needed.

CONCLUSIONS

Disregarding spawning aggregations can prevent accurate assessments that may cause stocks to collapse.

Hyperstability can be included using non-linear production functions such as the Cobb-Douglas. Ancillary information can also be used in data-poor situations.

The gulf corvina (*C. othonopterus*) forms seasonal spawning aggregations which increase its vulnerability. Currently, assessment and estimation of annual catch quotas are done disregarding hyperstability of the stock. This can be overcome using nonlinear production functions and ancillary, fisheries-independent data.

We found that the gulf corvina biomass is close to 25% of virgin stock, which requires precautionary measures to avoid economic fishery collapse compromising viability of this endemic species.

The gulf corvina fishery continues to occur and yields revenues not because of the randomness of common fisheries, but because of the spawning aggregations it relies upon. Costs of fishing are reduced and, therefore, profits are positively influenced by the gregarious nature of mega spawners in a relatively small space. Therefore, fishers and managers should reduce current fishing mortality and determine a maximum size limit so that mega spawners can continue to contribute to annual recruitment. A maximum size limit in combination with an annual quota need to strictly be enforced so that this endemic species can continue to be the basis of an important social and economic activity.

ACKNOWLEDGMENTS

R.U.S. thanks support by CONAHCYT, for a postdoctoral leave at CIBNOR, S.C. M.Á.C.M. thanks partial support from CONAHCYT.

REFERENCES

Alam, M.S., Liu, Q., Nabi, M.R.U. and Al-Mamun, M.A. 2021. Fish stock assessment for data-poor fisheries, with a case study of tropical Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) in the water of Bangladesh. Sustainability. 13(7): 1-23. https://doi.org/10.3390/su13073604.

Angelini, S., Armelloni, E.N., Costantini, I., De Felice, A., Isajlović, I., Leonori, I., Manfredi, C., Masnadi, F., Scarcella, G., Tičina, V. and Santojanni, A. 2021. Understanding the dinamics of ancillary pelagic species in the Adriatic Sea. Front. Mar. Sci. 8:728948. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.728948.

Baranov, F.I. 1918. On the question of the biological basis of fisheries. Nauchn. Issled. Ikhtiologicheskii Inst. Izv. 1: 81-128.

Barrowman, N.J. and Myers, R.A. 2000. Still more spawner–recruitment curves: the hockey stick and its generalizations. Can. J. Fish. Aq. Sci. 57: 665-676. https://doi.org/10.1139/f99-282.

Beverton, R.J.H. and Holt, S.J. 1957. On the Dynamics of Exploited Fish Populations. London: Great Britain Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 533 pp.

Burnham, K.P. and Anderson, D.R. 2002. Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach (2nd ed.), New York: Springer. 488 pp.

Caddy, J.F. and Mahon, R. 1996. Puntos de referencia para la ordenación pesquera = Reference points for fisheries management. Rome: FAO 347 pp.

Cobb, C.W. and Douglas, P.H. 1928. A theory of production. Am. Econ. Rev. 18: 139-165. https://www.jstor.org/stable/1811556.

Coppola, G. and Pascoe, S. 1998. A Surplus Production Model with a nonlinear catch-effort relationship. Mar. Res. Econ. 13: 37-50. https://doi.org/10.1086/mre.13.1.42629217.

Cotero-Altamirano, C.E., Enciso-Enciso, C., Hernández-Escalante, L., Zobeyda-Brasil, L., Valles-Ríos, H. and Venegas, B. 2018. Reproducción de la curvina golfina *Cynoscion othonopterus* en el Golfo de California [Reproduction of the gulf corvina *Cynoscion othonopterus* in the Gulf of California]. Cienc. Pesq. 26(2): 37-46.

Enciso-Enciso, C. 2014. Evaluación de la pesquería de curvina golfina *Cynoscion othonopterus* (Jordan & Gilbert, 1882) en el alto golfo de California [Assessment of the gulf corvina fishery *Cynoscion othonopterus* (Jordan & Gilbert, 1882) in the upper Gulf of California]. [MSc Thesis]. [Sinaloa (Mexico)]: Universidad Autónoma de Sinaloa. 65 pp.

[EDF] Environmental Defense Fund de México. 2016. Resultados económicos de la temporada de curvina golfina, Golfo de Santa Clara 2016 [Economic results of the gulf corvina season, Gulf of Santa Clara 2016. 29 pp.].

https://mexico.edf.org/sites/mexico.edf.org/files/resulteconcurvina2016_4comunidades_0.pdf (Accesed 10 January 2022).

Erisman, B.E., Allen, L.G., Claisse, J.T., Pondella, D.J., Miller, E.F. and Murray, J.H. 2011. The illusion of plenty: hyperstability masks collapses in two recreational fisheries that target fish spawning aggregations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 68: 1705-1716. https://doi.org/10.1139/F2011-090.

Erisman, B.E., Appel, A.M., MaCall, A.D., Román, M.J. and Fujita, R. 2014. The influence of gear selectivity and spawning behavior on a data-poor assessment of a spawning aggregation fishery. Fish. Res. 159: 75-87. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.05.013.

Erisman, B.E., Grüss, A., Mascareñas-Osorio, I., Lícon-González, H., Johnson, A.F. and *López-Sagástegui*, C. 2020. Balancing conservation and utilization in spawning aggregation fisheries: a trade-off analysis of an overexploited marine fish. ICES J. Mar. Sci. 77: 148-161. https://doi:10.1093/icesjms/fsz195.

Gherard, K.E., Erisman, B.E., Aburto-Oropeza, O., Rowell, K. and Allen, L.G. 2013. Growth, development, and reproduction in gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*). Bull. South. Cal. Acad. Sci. 112(1): 1-18. https://doi.org/10.3160/0038-3872-112.1.1.

Haddon, M. 2011. Modelling and quantitative methods in fisheries, 2nd ed. Boca Raton, FLA: Chapman & Hall/CRC 406 pp.

Haggarty, D.R. and King, J.R. 2006. CPUE as an index of relative abundance for nearshore reef fishes. Fish. Res. 81(1): 89-93. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.05.015.

Haigh, I.D., Elio, M. and Pattiaratchi, C. 2011. Global influences of the 18.61 year nodal cycle and 8.85 year cycle of lunar perigee on high tidal levels. J. Geophys. Res. 116, C06025. https://doi:10.1029/201 0JC006645.

Hannesson, R. 1983. Bioeconomic production function in fisheries: theoretical and ernpirical analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 968-982. https://doi.org/10.1139/f83-123.

Harley, S.J., Myers, R.A. and Dunn, A. 2001. Is catch-per-unit-effort proportional to abundance? Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58: 1760-1772. https://doi.org/10.1139/cjfas-58-9-1760.

Hilborn, R., Amoroso, R.O, Anderson, C.M., Baum, J.K., Branch, T.A., Costello, C., de Moor, C.L., Faraj, A., Hively, D., Jensen, O.P., Kurota, H., Richard, L., Mace, P., McClanahan, T., Melnychuk, M.C., Minto, C., Osiol, G.Ch., Parma, A.M., Pons, M., Segurado, S., Szuwalski, C.S., Wilson, J.R. and Ye, Y. 2020. Effective fisheries management instrumental in improving fish stock status. Proc. Nat. Acad. Sci. 17: 2218-2224. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1909726116.

[Inapesca] Instituto Nacional de Pesca y Acuacultura. 2021. Acuerdo por el que se establece el volumen de captura permisible para el aprovechamiento de curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*), en aguas de jurisdicción federal del Alto Golfo de California y delta del río Colorado para la temporada de pesca 2021 [Agreement establishing the volume of allowable catch for the use of Gulf curvina (*Cynoscion othonopterus*), in waters of federal jurisdiction of the Upper Gulf of California and Delta of the Colorado River for the 2021 fishing season]. Dictamen Técnico RJL/INAPESCA/DGAIPP/0006/2021. Mexico City: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. https://cofemersimir.gob.mx/mirs/51050

Jensen, A.L. 1974. Leslie matrix models for fisheries studies. Biometrics 30(3): 547-551. https://doi:10.2307/2529208.

Jensen, A.L. 1996. Beverton and Holt life history invariants result fromo ptimal trade-off of reproduction and survival. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 820-822. https://doi.org/10.1139/f95-233.

Katsanevakis, S. 2006. Modelling fish growth: Model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. Fish. Res. 81: 229-235. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.07.002.

Kenchington, T.J. 2014. Natural mortality estimators for information-limited fisheries. Fish and Fisheries. 15(4): 533-562. https://doi.org/10.1111/faf.12027.

Kimura, D. and Tagart, J. 1982. Stock reduction analysis, another solution to the catch equations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 1467-1472. https://doi.org/10.1139/f82-198.

Licón González, H.A., Sanjurjo-Rivera, E., Olivares-Bañuelos, N.C., Vázquez-Vera, W.L. and Ortiz-Rodríguez, R. 2023. Participative management experiences in the corvina fishery at the upper Gulf of California. Reg. y Soc. 35, e1678. https://doi.org/10.22198/rys2023/35/1678.

Mackinson, S., Sumaila, U.R. and Pitcher, T.J. 1997. Bioeconomics and catchability: fish and fishers behavior during stock collapse. Fish. Res. 31: 11-17. https://doi.org/10.1016/S0165-7836(97)00020-9.

Martell, S.J.D.; Pine, W.E., Walters, C.J. 2008. Parameterizing age-structured models from a fisheries management perspective. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 65(8): 1586-1600. https://doi:10.1139/f08-055.

Maunder, M.N., Sibert, J.R., Fonteneau, A., Hampton. J., Kleiber, P. and Harley, S.J. 2006. Interpreting catch per unit effort data to assess the status of individual stocks and communities. ICES J. Mar. Sci. 63: 1373-1385. https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2006.05.008.

Meissa, B., Dia, M., Baye, B.C., Bouzouma, M., Beibou, E. and Roa-Ureta, R.H. 2021. A comparison of three data-poor stock assessment methods for the pink spiny lobster fishery in Mauritania. Front. Mar. Sci. 8. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.714250.

Melnychuk, M.A., Peterson, E., Elliott, M. and Hilborn, R. 2017. Fisheries management impacts on target species status. Proc. Nat. Acad. Sci. 114: 178-183. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1609915114.

Mendívil-Mendoza, J.E., Aragón-Noriega, E.A., Arreola-Lizárraga, J.A., Rodríguez-Domínguez, G., Castillo-Vargasmachuca, S.G. and Ortega-Lizárraga, G.G. 2018. Indicadores de sustentabilidad para la pesquería de curvina golfina *Cynoscion othonopterus* en el Alto Golfo de California = Sustainability fishery indicator for Gulf corvina *Cynoscion othonopterus* in the Upper Gulf of California. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 53(1): 119-130. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572018000100119.

Methot, R.D. and Wetzel, C.R. 2013. Stock synthesis: A biological and statistical framework for fish stock assessment and fishery management. Fish. Res. 142: 86-99. https://doi:10.1016/j.fishres.2012.10.012.

Pauly, D. 1980. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. ICES J. Mar. Sci. 39: 175-192. https://doi.org/10.1093/icesjms/39.2.175.

Pascoe, S., Kahui, V., Hutton, T. and Dichmont, C. 2016. Experiences with the use of bioeconomic models in the

management of Australian and New Zealand fisheries. Fish. Res. 183: 539-548. doi:10.1016/j.fishres.2016.01.008.

Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Bull. Fish. Res. Board Can. 191: 1-382.

Román-Rodríguez, M.J. 2000. Estudio poblacional del chano norteño, *Micropogonias megalops* y la curvina golfina *Cynoscion othonopterus* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae), especies endémicas del Alto Golfo de California, México [Population study of the northern chano, *Micropogonias megalops* and the gulf curvina *Cynoscion othonopterus* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae), endemic species of the Upper Gulf of California, Mexico]. [Sonora (México)] Instituto del Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora. Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. L298. CONABIO. Mexico. Also available on https://www.snib.mx/iptconabio/resource?r=SNIB-L298 (Accesed 10 January 2022).

Rose, G.A and Kulka, D.W. 1999. Hyperaggregation of fish and fisheries: how catch-per-unit-effort increased as the northern cod (*Gadus morhua*) declined. Can. J. Fish. Aquat. Res. 56(Suppl. 1): 118-127. https://doi.org/10.1139/cjfas-56-S1-118

Ruelas-Peña, J.H., Valdez-Muñoz, C. and Aragón-Noriega, E.A. 2013. La pesquería de la corvina golfina y las acciones de manejo en el Alto Golfo de California, México = Analysis of the corvina gulf fishery as a function of management actions in the Upper Gulf of California, Mexico. Lat. Amer. J. Aquat. Res. 41(3): 498-505. https://doi:103856/vol41-issue3-fulltext-13.

Schnute, J. 1987. A General Fishery Model for a Size-Structured Fish Population. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44(5): 924-940. https://doi:10.1139/f87-111.

Ulltang, Ø. 1996. Stock assessment and biological knowledge: can prediction uncertainty be reduced? ICES J. Mar. Sci. 53: 659-675. https://doi.org/10.1006/jmsc.1996.0086.

Urías-Sotomayor, R., Rivera-Parra, G.I., Martínez-Cordero, F.J., Castañeda-Lomas, N., Pérez-González, R. and Rodríguez-Domínguez, G. 2018. Stock assessment of jumbo squid *Dosidicus gigas* in northwest Mexico. Lat. Am. J. Aquat. Res. 46(2): 330-336. https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-8.

Walter, J.F. and Porch, C.E. 2012. Modeling terminal-year fishing mortality rates in western Atlantic bluefin tuna virtual population analyses. Aquat. Living Resour. 25: 333-340. https://doi.org/10.1051/alr/2012037.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Biochemical and molecular characterization of glucoamylase produced by the *Aspergillus niger* strain HPD-2

Caracterización bioquímica y molecular de la glucoamilasa producida por la cepa de *Aspergillus niger* HPD-2

Fernando Pérez-Rodríguez[1,2], Raquel Pliego-Arreaga[3], Guillermo Antonio Silva-Martínez[1,4], Juan Antonio Cervantes-Montelongo[1,3]*

[1] Departamento de Ingeniería Bioquímica y Ambiental, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya, Guanajuato, 38010, México.
[2] Departamento de Ciencias Biomédicas, Escuela de Medicina, Universidad Quetzalcóatl Irapuato, Irapuato, Guanajuato, 36615, México.
[3] Escuela de Medicina de la Universidad de Celaya, Celaya, Guanajuato, 38080, México.
[4] Cátedras CONACYT- Tecnológico Nacional de México, Departamento de Ingeniería Bioquímica y Ambiental, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya, Guanajuato, 38010, México.

ABSTRACT

Aspergillus niger HPD-2 has interesting growth characteristics, it grows at a temperature of 38 ºC and pH of 3, it is also known to produce various enzymes of commercial interest such as glucoamylase, which is present in the medium even under non-inducible conditions and has important activity characteristics such as an optimum temperature of 70 ºC and an optimum pH of 3-4. These features are very important because they will help to minimize microbial contamination risk in industrial hydrolysis processes. For the characterization of *A. niger* HPD-2 glucoamylase, the presence and activity of the enzyme were verified in a non-inducing medium. The apparent kinetic parameters K_m, K_i and V_{max} were determined at 6.66 mM, 0.601 M and 66.5 mM/min, respectively, as well as its optimum pH and temperature activity (pH 3 and 70 °C). Comparatively speaking, these data are competitive against those reported for similar purified enzymes. On the other hand, DNA sequence analysis of *A. niger* HPD-2 glucoamylase gene showed no changes in the promoter region or starch-binding domains. Therefore, the presence of the enzyme in a non-inducing medium could be related to changes in a repressor protein CreA.

Keywords: Glucoamylase, *A. niger*, biochemical characterization, molecular characterization, enzyme kinetic.

RESUMEN

Aspergillus niger HPD-2 presenta características particulares de cultivo, crece a una temperatura de 38 ºC y a un pH de 3, además se sabe que produce diversas enzimas de interés comercial como la glucoamilasa, que se encuentra presente en el medio aún bajo condiciones no inducibles y tiene características de actividad interesantes como son, una temperatura óptima de 70 ºC y un pH óptimo de 3-4. Estas características son muy importantes porque ayudarán a minimizar el riesgo de contaminación microbiana en procesos de hidrólisis industrial. Para la caracterización de la glucoamilasa de *A. niger* HPD-2 se comprobó la presencia y actividad de la enzima en un medio no inductor. Se determinaron los parámetros cinéticos aparentes K_m, K_i, y V_{max}, 6.66 mM, 0.601 M y 66.5 mM/min respectivamente, así como su temperatura y pH óptimos de actividad (pH 3 y 70 °C). Comparativamente hablando, estos datos son bastante competitivos que aquellos reportados para enzimas similares purificadas. Por otro lado, el análisis de la secuencia de ADN del gen de la glucoamilasa de *A. niger* HPD-2 mostró que no existen cambios en la región promotora ni en los dominios de unión al almidón. Por lo que la presencia de la enzima en un medio no inductor podría estar relacionada con cambios en una proteína represora CreA.

Palabras clave: Glucoamilasa, *A. niger*, caracterización molecular, caracterización bioquímica, cinética enzimática.

INTRODUCTION

Aspergillus niger is a saprophytic, aerobic, filamentous fungus belonging to the Trichocomaceae family. In nature, it is found in soil and has a wide worldwide distribution, reported mainly in the tropics with high frequency in hot and humid places (Rippel-Baldes, 1955; Baker, 2006). This microorganism is known for its ability to produce a wide variety of enzymes and metabolites of industrial interest (Cairns *et al*., 2018; Lime *et al*., 2019; Li *et al*., 2020b; Cairns *et al*., 2021) such as pectinase (Grassin and Fauguenbergue, 1999; Li *et al*., 2020b), tannase (Papadaki and Mantzouridou, 2023; Viniegra *et al*., 2003), amylase (Henrissat *et al*., 1991; An *et al*., 2019), cellulase and hemicellulase (Grassin and Fauguenbergue, 1999; Liu, 2021), lipase (Schuster *et al*., 2002), glucose oxidase, catalase (Berka *et al*., 1992; EFSA CEP Panel, 2023), and economic important metabolites such as citric acid, among others (Behera, 2020; Lima *et al*., 2019; Schuster *et al*., 2002; Viniegra *et al*., 2003; Yu *et al*., 2021).

The *A. niger* strain HPD-2 was isolated from soil in 1979 at the Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Veracruz by Patiño Hernández to study microorganisms capable of hydrolyzing starches, to establish a process for the use of cassava by the fermentative pathway (Baltazar-Ramírez, 1984;

*Correspondence author: Juan Antonio Cervantes-Montelongo
e-mail: antonio.cervantes@itcelaya.edu.mx
Received: April 21, 2023
Accepted: November 21, 2023
Published: December 15 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26i1.2024

Carballo and Melgarejo, 1986; Ceseño-Gamez, 1988). Later, it was classified and identified as a strain, through molecular analysis by our work group (Cervantes-Montelongo, 2009). According to the literature, *A. niger* grows at a temperature range of 28-30 ºC within pH values from 4.5 to 6 (Abarca *et al*., 2002); the *A. niger* HPD-2 strain presents interesting growth characteristics such growth at 38 ºC and pH of 3. This point suggests that its enzymatic systems used for the assimilation of carbon sources are viable even under these conditions. Previous analyzes of an *A. niger* strain HPD-2 crude extract glucoamylase, showed that it has an optimum temperature and pH of 60 ºC and 3 respectively (for more information see Supplementary Table 1) (Carballo and Melgarejo, 1986). This is different from that reported for other strains; these characteristics could minimize the risk of microbiological contamination within industrial processes. Likewise, according to the reported data, *A. niger* HDP-2 presents glucoamylase activity in a non-inducing medium (Carballo and Melgarejo, 1984), suggesting that the synthesis of the enzyme could be deregulated.

A. niger is capable of hydrolyzing starch because it secretes two enzymes, α-amylase and glucoamylase (GA), the latter encoded by the *glaA* gene. The molecular mechanisms that regulate the expression of the *glaA* gene have not been fully elucidated; however, in eukaryotic systems such as *A. niger* and *A. nidulans*, the CreA boxes regulate catabolite repression. CreA protein is the most studied transcription factor known as carbon catabolite repressor in *Aspergillus* ssp. (de Assis *et al*., 2021), which is encoded in a gene called the *creA* gene (Dowzer and Kelly, 1991).

Currently, the demand for thermostable amylases is increasing since hydrolysis processes are carryied out at high temperatures, which minimizes the risk of microbiological contamination and reduces reaction time (Bertoldo and Antranikian, 2002; Pandey *et al*., 2000). Also, glucoamylase is one of the most important enzymes used in the alimentary industry (Zong *et al*., 2022), added to this, recently there has been an effort using molecular techniques, to make *A. niger* isolates safer in the food industry due to the synthesis of mycotoxins by some strains as well as increasing the amount of secreted proteins (Li *et al*., 2020a; Liu *et al*., 2022).

The present work focuses on expanding the characterization of the *A. niger* HDP-2 glucoamylase, not only at an enzymatic level but also at a molecular level. This is important since, thanks to factors such as thermostability and acid resistance, the enzyme can have several industrial advantages such as reduced risk of media contamination, and that it can be recovered and partially purified with relative ease, which could be used in the production of glucose syrups.

Table 1. Glucoamylase activity values per mg of dry weight.
Tabla 1. Valores de la actividad de la glucoamilasa por mg en peso seco.

Carbone source	Time (h)	Activity per mg dry weight (E-03)	Total activity (E-03)	Activity per mg of total protein (E-03)
Glucose	36	0.324	7.2	31.7
	48	8.900	4.4	30.4
	72	7.900	6.3	65.6
Starch	36	0.255	2.5	26.1
	48	9.200	1.6	12.2
	72	9.100	5.4	22.3
Glucose + Starch	36	7.400	3.5	25.4
	48	0.102	5.4	57.5
	72	6.300	5.4	27.0
Maltose	36	0.151	3.0	47.7
	48	0.196	5.4	218.5
	72	5.600	3.9	28.3

(n = 2).

MATERIAL AND METHODS

Biological material and culture conditions

The *A. niger* HDP-2 strain was propagated in different culture media according to the experimental requirements. For its propagation, spores were inoculated in inclined tubes containing PDA medium (NutriSelect® Plus), and incubated for eight days at 38 ºC until the fungus covered the entire surface of the agar. The strain was reseeded periodically to be always available during the project.

To corroborate the presence of the enzyme in a non-inducing medium, flask-level tests were carried out in a liquid minimal medium (formulation: carbon source 10 g/L; $(NH_4)SO_2$ 2.5 g/L; K_2PO_4 1g/ L; pH 3 adjusted with concentrated HCl). The carbon sources used were glucose, starch, glucose and starch combination (1:1 proportion), maltose, and glycerol. All enzyme tests were performed in duplicate with each different carbon source using incubation times of 36, 48, and 72 h at 38 °C and 150 rpm, using an initial inoculum of 10^6 spores/mL. Depending on the carbon source of the experiment, the spores used came from a solid culture medium with the same carbon source (formulation: carbon source 10 g/L; $(NH_4)_2SO_2$ 2.5 g/L; K_2HPO_4 1 g/L; bacteriological agar 30 g/L).

The biomass produced from the spores propagation was placed in a watch glass and dried in the oven at 60 °C for 12 h, after which dry weight was recorded.

Biochemical determinations

For the quantitative determination of reducing sugars present in the filtered media corresponding to each of the carbon sources, the DNS method was used (Miller, 1959). The amount of residual starch present in the corresponding filtered media where starch was used as a carbon source was determined by iodometry (Anand, 2015). To quantify the total protein present in the filtrates of each medium, the Lowry method was used (Lowry *et al*., 1951). For the enzyme activity determinations, aliquots of the different culture media and times were placed in a water bath at 60 ºC for 10 minutes. Subsequently, aliquots were taken from each tube for the tests of reducing sugars and residual starch, comparing them with the same samples without heat treatment and control solutions.

Concentration of secreted enzymes

To concentrate the enzymes in the medium of the glucose and starch culture medium previously inoculated with *A. niger* HDP-2, a BUCHI model RE124 rotary evaporator was used, until the initial volume was reduced between 80-90 %, using a maximum temperature of 60 °C. A dialysis process was then performed on the concentrated filtrates using WWR Scientific Inc. dialysis tubes with a cut-off size of 12 - 14 kDa, with low agitation in a 0.05 M pH 3 acetate buffer solution, at 4 ºC for approximate 24 h. Afterward, the activity was measured employing the aforementioned techniques, both of them, the filtrate concentrated by rotary evaporation, as well as the lyophilized.

Effect of pH and temperature on enzyme activity in concentrated enzyme filtrates

To characterize the glucoamylase, the behavior of the activity concerning temperature and pH was measured. Activity tests were performed on the concentrated and dialyzed extract to evaluate different pH values. It was tested from a pH of 2 to 9 with intervals of one pH unit. To ensure different pH values, several buffers were used, for pH values of 2 to 4, 0.05 M acetate regulator was used, for 5 to 7, a 0.05 M phosphate regulator, and finally for pH 8 and 9, the 0.05 M TRIS-HCl regulator. The substrate solubilization, which was gelatinized starch, was carried out in each case in the corresponding regulator. In the same way, to identify the optimum activity temperature, concentrated and dialyzed extract was used in a range between 30 to 80 ºC, every 10 ºC at pH 3. All tests were performed in duplicate.

To calculate the apparent enzymatic constants, assays were carried out measuring glucoamylase activity at a temperature of 70 ºC and a pH of 3 using different substrate concentrations (gelatinized starch) of 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g/L.

Molecular characterization

For DNA genomic extraction from *A. niger* HDP-2 strain mycelium, the Dellaporta method (Dellaporta *et al*., 1983) was used. For sequence analysis, PCRs were performed to amplify different regions of the *glaA* gene. Oligonucleotides were synthesized for the open reading frame, the promoter region, as well as for the region corresponding to the SBD (Starch Binding Domain).

The amplification products were visualized by 1.2 % agarose gel electrophoresis and bands were purified with the Silica Bead DNA Gel Extraction kit (Fermentas, Waltham, MA, USA). The purified fragments were used directly for the ligation into the pCR®4-TOPO vector (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Once the plasmids were ligated, they were introduced into *Escherichia coli* cells (MultishotTM Strimwell TOP10 from Invitrogen, Waltham, MA, USA) for preservation and propagation. Kanamycin and ampicillin (50 µg/mL) were used as selection marker antibiotics. Plasmid DNA extraction was performed using the GeneJet Plasmid Miniprep kit (Fermentas, Waltham, MA, USA), and to verify the PCR product insert of selected clones, the pDNA was digested with the enzyme *Eco*RI (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

The vectors containing the fragments of interest were sequenced, analyzed, and compared with the NCBI GeneBank database.

Glucoamylase regulation assay

Total RNA from *A. niger* HDP-2 mycelium, previously cultured in the presence of glucose or starch as a carbon source, was extracted under the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) protocol. First-strand synthesis and RT-PCR were performed using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Waltham, MA, USA), analyzed by semiquantitative rt-PCR at the transcription level of the SBD gene.

RESULTS

Metabolic kinetics

The amount of biomass produced by *A. niger* HDP-2 was measured for the different culture media using diverse carbon sources (Figure 1). In all cases, growth was in mycelial form, and the one with the highest yield was in the medium that had a mixture of glucose and starch; on the other hand, the one that contained glycerol as a unique carbon source had the lowest yield. A similar amount of biomass can also be observed in the glucose and starch medium, like in the glucose medium.

To determine the number of carbohydrate molecules used by the fungus for its growth, and to give us an idea of the possible presence and extracellular activity of the enzyme glucoamylase, the determination of reducing sugars was carried out (Figure 1A).

As expected, in the glucose medium, the amount of reducing sugars decreased over time which correlates with the increase in biomass at the same period (Figure 1B). However, at 72 h of incubation a remaining number of sugars are still observed; considering that the proportion of biomass obtained is low, compared to other references, there are still reducing sugars available for growth.

For the medium containing starch, the amount of reducing sugars produced by the enzymatic hydrolysis increased as time passed. At 36 and 48 h of incubation, the value of the quantification is very similar, which could suggest that the fungus consumed sugars produced by the hydrolysis of the starch present in the medium, and a significant increment of this parameter was not detected until 72 h.

In the case of the medium with glucose and starch mix, the amount of reducing sugars decreased from 0 to 36 h, indicating consumption. On the other hand, for the 36 to 48 h period, the reducing sugars increased as a result of the hydrolysis of starch in the medium and the possible activity of the enzyme under not-inducing conditions.

On the other hand, the amount of residual starch present in the media with starch and the mixture glucose+starch after the growth of *A. niger* HDP-2 was determined. As shown in Figure 2A, after 36 h the most marked decrease in residual starch occurs, although this behavior was observed from the

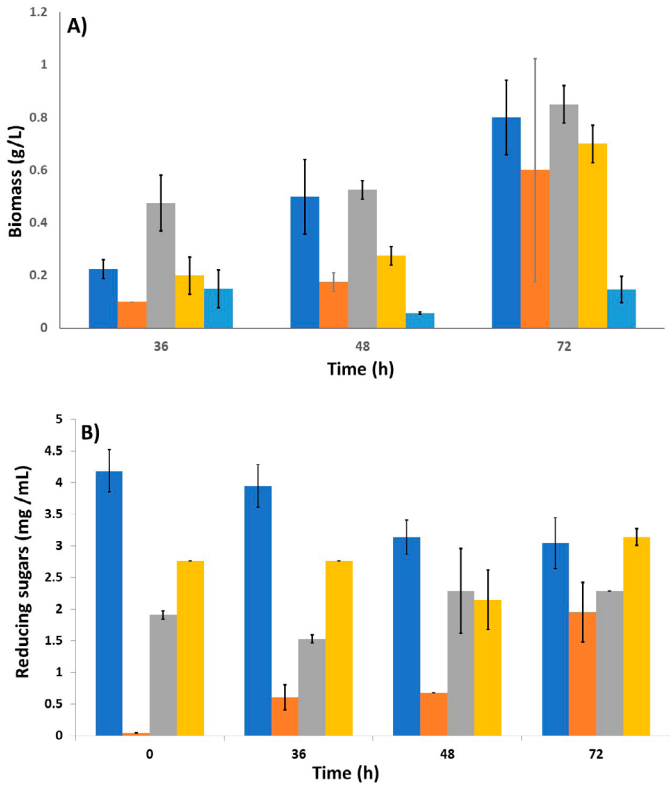


Figure 1. Comparison of biomass and reducing sugars generated by *A. niger* HDP-2 in culture media using different carbon sources at different times. A) Biomass generated by *A. niger* HDP-2 in culture media using (Blue bar) Glucose, (Orange bar) Starch, (Gray bar) Glucose + Starch, (Yellow bar) Maltose, and (pale blue bar) Glycerol (n = 2); B) Kinetics of reducing sugars present in the culture media using different carbon sources at different times, (Blue bar) Glucose, (Orange bar) Starch, (Gray bar) Glucose + Starch, and (Yellow bar) Maltose (n = 2).
Figura 1. Comparación de la biomasa y los azúcares reductores generados por *A. niger* HDP-2 en medio de cultivos usando diferentes fuentes de carbono.

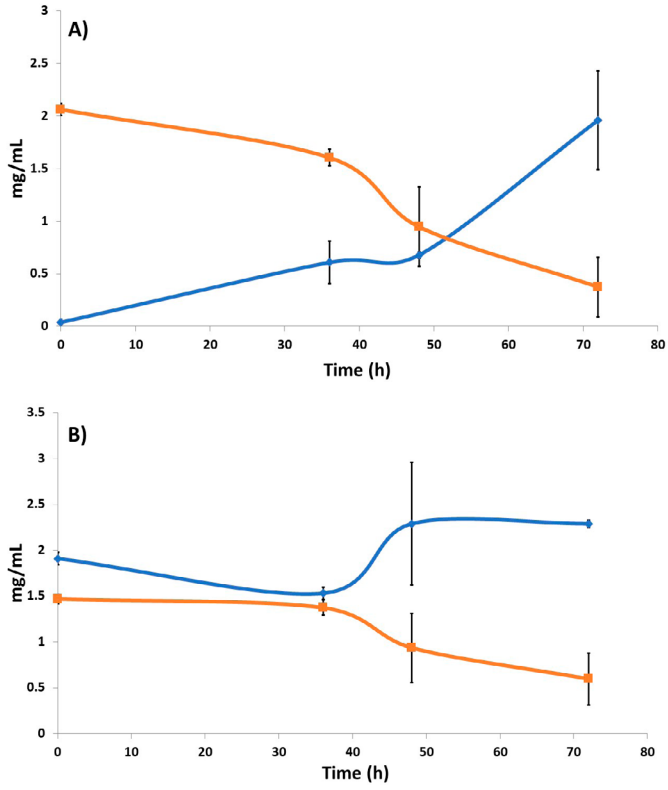


Figure 2. Comparison graph between reducing sugars and residual starch in the culture media. A) Using starch as a unique carbon source. The increase in the amount of reducing sugars and the decrease in residual starch in the medium at 0, 36, 48, and 72 h are shown: (blue line) reduced sugars; (orange line) residual starch (n = 2); B) Using glucose and starch mix as carbon sources. The increase in the amount of reducing sugars and the decrease in residual starch at 0, 36, 48, and 72 h are shown: (blue line) reducing sugars; (orange line) residual starch (n = 2).
Figura 2. Gráfica de comparación entre el almidón y azúcares reductores en el medio de cultivo.

beginning of the experiment, indicating starch hydrolysis, and suggesting glucoamylase activity. At 72 h, the residual starch reduced considerably, up to 81.56 % compared to time zero. However, this is not reflected in the biomass since a greater amount would be expected with greater hydrolyzed substrate availability.

When comparing reducing sugars and residual starch using a glucose and starch mixture medium (Figure 2B), at 36 h a marked decrease in the amount of residual starch was evident, which is consistent with the increase in the amount of reducing sugars. After 48 h, a decrease in residual starch is observed again, but this was not observed in the amount of reducing sugars. This could be explained by the fungus sugar consumption, which is reflected in an increase in biomass (Figure 1A). Interestingly, starch hydrolysis was observed early on, which suggested a deregulated synthesis of glucoamylase. This was taken with caution and corroborated with activity measurement experiments that were subsequently performed.

Measurement of protein secreted by *A. niger* HDP-2 to the culture medium

The amount of total extracellular protein present in the culture media was measured with the Lowry method (Lowry *et al*., 1951), to obtain a parameter for specific activity tests. One aspect to consider is that the amount of total protein is being measured, not only the amount of glucoamylase.

At first, it was observed that at 36 h a greater amount of total protein was obtained in the glucose medium, which decreased at 48 and 72 h. This could be explained since it is known that *A. niger* can produce proteolytic enzymes (Shcuster *et al*., 2002) that could hydrolyze proteins present in the medium. On the other hand, in the case of the starch medium, a higher amount of protein present in the medium is recorded over time. Since it is a medium with a carbon source that needs to be hydrolyzed, the fungus reacts to synthesize the necessary enzymes for this process, which correlates with the increment of reducing sugars and the decrease of residual starch (Figure 2A). In the maltose medium and the glucose and starch mixture, the behavior in terms of total protein is very similar. A decrease was shown at 48 h compared to 36 h

and an increase at 72 h compared to 48 h. In the glucose and starch mix medium, there was an increase in reducing sugars and a decrease in residual starch at 36 h (Figure 2B), which indirectly indicates the presence of glucoamylase detected in the measurement of total protein. At 48 h, a reduction in total protein is observed, which could be explained by the action of proteolytic enzymes synthesized by the fungus.

The reducing sugars increased by the time of 36 h and are maintained at 72 h, this can be explained by the fact that the glucoamylase remains active or was continuously synthesized by the fungus. In the medium with glycerol, protein was not detected. In conclusion, considering all the results mentioned above, the presence of glucoamylase in the media was indirectly detected.

Glucoamylase activity per mg of dry-weight biomass

The existence of enzymatic activity by the glucoamylase produced by the *A. niger* HPD-2 fungus from different carbon sources was determined. Enzymatic activity was detected in all carbon sources used, except glycerol (Table 1). Glucoamylase activity was detected in the medium with glucose as carbon source at 36, 48 and 72 h, even though glucose is not an inducing carbon source for the synthesis of this enzyme. In addition to the activity in this medium, the highest activity value was also observed at 36 h, followed by the corresponding starch medium and finally for maltose at 48 h.

Parallel to these, similar analyses were carried out on samples from media richer in nutrients to compare if there was a greater enzyme synthesis by the fungus while it was growing in a medium not so limited. The results obtained were relatively similar to the presence of glucoamylase in a non-inducing medium and no differences in activity values were observed (Supplementary Table 2).

Apparent kinetic parameters of *A. niger* HDP-2 glucoamylase

To determine the optimal pH and temperature for the *A. niger* HDP-2 glucoamylase activity, the solution used was from rotary evaporation dialyzed filtered medium of fungal growth in starch as a carbon source. As a result, a pH of 3 was the optimum for enzymatic activity and the optimum temperature for activity was 70 °C (Figure 3).

To determine the K_m and V_{max} values of the *A. niger*-HDP2 glucoamylase, enzyme kinetics were carried out at 70 °C, pH 3 and 250 rpm using different starch concentrations from 5 to 70 g/L, measuring the amount of reducing sugars at two-minute periods (Figure 4). From this data, the linear phases of each kinetic were taken and linearized to obtain the reaction rate for each condition. The detailed procedure is described in the section "Calculation of apparent K_m and V_{max}" in the supplementary material.

Based on these results, the kinetics obtained under optimal conditions for the enzyme did not adhere to the Michaelis-Menten model (Figure 5A). An inhibition behavior was observed, which could be caused by the increase in substrate concentration since the reaction speed take on increasingly lower values once the substrate concentration is increased (in the section "Kinetics Andrews model" in supplementary material). To calculate the K_m and V_{max} apparent values, the Andrews model (1968) was chosen. Comparing the experimental and the estimated data, it seems that our results fit better in this kinetic model (Figure 5B and Table 2). The apparent K_m was 1.08 g L^{-1} (6.6 mM), a competitive value compared to those reported by glucoamylases produced by other fungal strains, as shown in Table 3. This result indicates

Table 2. Comparison of HDP-2 glucoamylase kinetics rates of experimental and calculated values by the Andrews model.
Tabla 2. Comparación de los valores cinéticos experimentales y calculados con el modelo de Andrews de la glucoamilasa HDP-2.

Experimental substrate concentration (g/L)	V_{exp} (mg/mL * min) (E-03)	V_{cal} (mg/mL * min) (E-03)	$(V_{exp} - V_{cal})^2$
0	0	0	0
5	8.10	8.551291	2.03663E-07
20	10.70	8.611407	4.36222E-06
50	7.90	7.067980	6.92257E-07
60	5.00	6.640006	2.68962E-06
70	4.80	6.257172	2.12335E-06
		Squared error	1.00711E-05

Tags: V_{exp}, V experimental; V_{cal}, V calculated. The squared error is displayed.

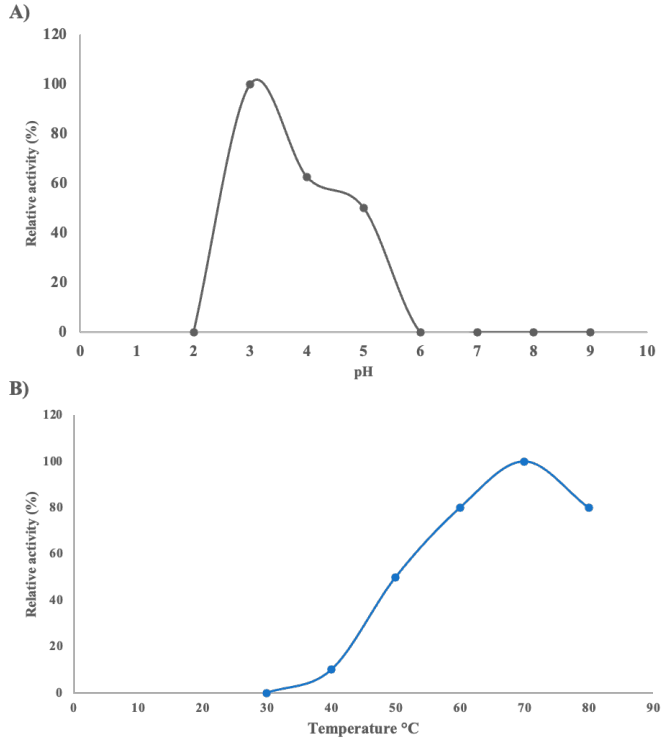


Figure 3. Effect of pH and temperature on the activity of the glucoamylase secreted by *A. niger* HDP-2. A) Activity tests varying the pH per unit from 2 to 9; B) Activity tests varying the temperature from 30 to 80 °C at pH 3.
Figura 3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la glucoamilasa secretada por *A. niger* HDP-2.

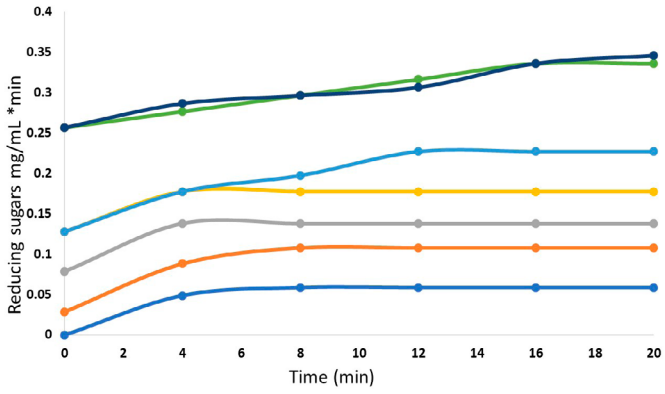


Figure 4. Enzymatic kinetics of glucoamylase-HDP-2 using different concentrations of starch for the calculation of kinetic parameters. From bottom to top, (blue line) 10 g/L, (orange line) 20 g/L, (gray line) 30 g/L, (yellow line) 40 g/L, (pale blue line) 50 g/L, (green line) 60 g/L, (dark blue line) 70 g/L.
Figura 4. Cinética enzimática de la glucoamilasa HDP-2 usando diferentes concentraciones de almidón para calcular los valores cinéticos.

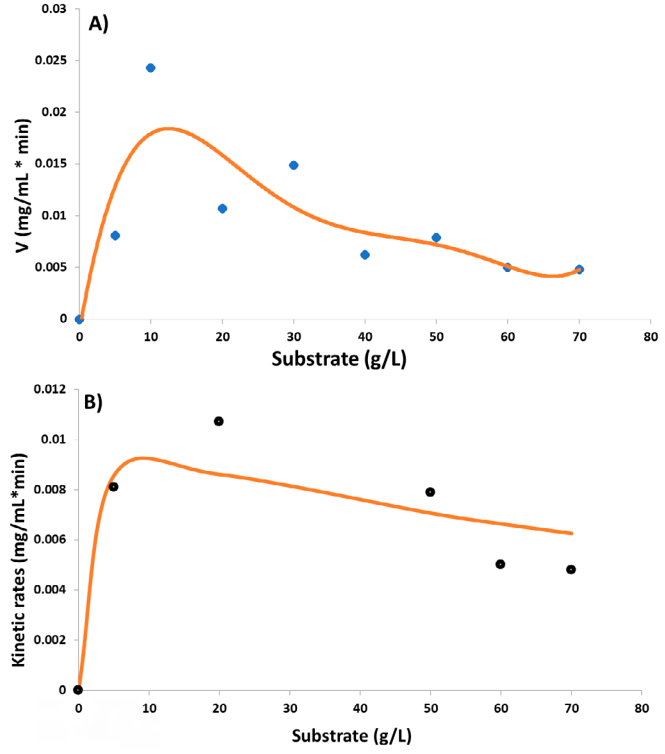


Figure 5. Data adjustment to different kinetic models. A) Michaelis-Menten model: diamonds represent the experimental data obtained, and the solid line represents the fit to the calculated Michaelis-Menten model values; B) Andrews model: circles represent the experimental data obtained, and the solid line represents the fit to the calculated Andrews model values.
Figura 5. Datos ajustados a diferentes modelos cinéticos.

that the glucoamylase produced by *A. nigger* HPD2 strain presents a good affinity for its substrate. Although it should be noted that it is an apparent value and to make a good comparison, a kinetic study using a purified enzyme is needed. Nevertheless, these reference values indicate that they are not so far from a real value, considering that Silva *et al*. (2005) reported a K_m of 4.76 g L^{-1} for a crude extract, unlike the other values that are for purified enzymes.

Table 3. Comparison of K_m and V_{max} apparent values of glucoamylase from *A. niger* HDP-2 and comparative data from bibliographical references.
Tabla 3. Comparación de los valores la K_m y V_{max} aparente de la glucoamilasas de *A. niger* HDP-2 y datos comparativos de otras referencias.

	V_{max}	K_m (g L^{-1})	K_i (g L^{-1})
Glucoamylase *A. niger* HDP-2 (this work)*	0.0108 mg min^{-1}	1.08	97.56
Silva *et al*., 2005*	8.58 µmol min^{-1}	4.76	
Arica *et al*., 2000+	82.7 µmol min^{-1}	2.3	
Bahar and Çelebi, 2000+	31.64 µmol min^{-1}	0.48	
Riaz *et al*., 2012+	283 U mg^{-1} protein	0.25	
He *et al*., 2017+	8.24 E-02 mg mL^{-1} min^{-1}	2.51	
Banerjee and Ghosh, 2017+	35.03 U $µl^{-1}$ min^{-1}	0.387	

Data from bibliographical references are shown. * Apparent value; + Real value.

On the other hand, the calculated V_{max} value is 66.5 mM min^{-1} (0.0108 mg min^{-1}), much below the range compared with data reported by other researchers (Table 3). It is important to mention that V_{max} in the Andrews model is limited by the K_i value; a relatively small K_i value, in this case, indicates a strong inhibition, producing lower V_{max} values.

In this context, apparent kinetic properties as well as optimum temperature and pH activity of glucoamylase from *A. niger* HPD strain suggest that it may be used commercially for the production of glucose in starch processing as well as in the food industry.

Molecular analysis

In order to identify possible changes in the sequences of the promoter region of the *glaA* gene (600 bp), *glaA* gene ORF (1900 bp) and SBD (300 bp) PCR amplification was used, followed by a cloning process of each of the amplicons as described in Material and Methods. The results are shown in Figure 6.

ands for the regions of interest in the selected clones were obtained, and strikingly, for the fragment of the promoter region, two bands with sizes of approximately 600 and 200 bp are present (Figure 6), indicating the possible presence of an internal cutting site. Searching for an internal cutting site, it was found that this sequence indeed has this restriction site, and the two fragments obtained had the expected sizes. With these results, it was concluded that the cloned PCR products existed in the selected constructions, and we proceeded to obtain their sequence.

Comparing the sequences obtained with the NCBI database, no changes in those sequences were detected in any of the cases. As no changes were detected in the promoter region of the *glaA* gene, specifically in the *creA* boxes, that are directly related to catabolite repression by carbon sources, it is possible that the presence of the enzyme in a non-inducing medium is linked to changes in the *creA* gene or in its promoter region, or possibly in some transcription factor of the *creA* or *glaA* genes. Another possible explanation is that the positive regulation by the presence of glucose 6-phosphate on the *CreA* gene could be affected and that the enzyme necessary for this phosphorylation could also be affected at some level of its synthesis (Strauss *et al*., 1999).

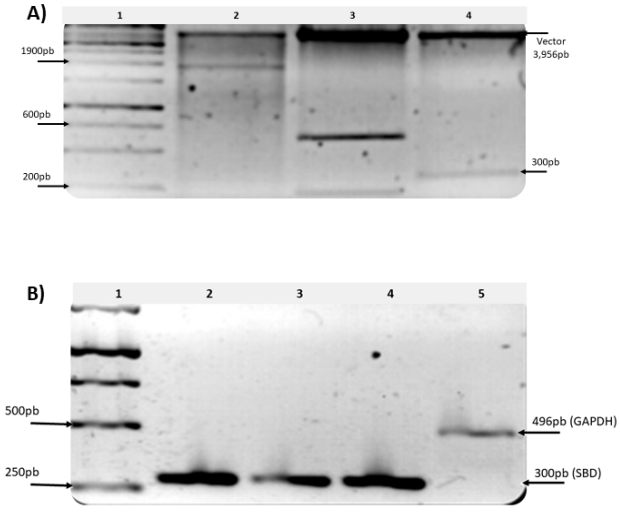


Figure 6. Molecular analysis of glucoamylase-HDP-2 in an EtBr-stained 1.2% agarose gel. A) Digestion of the plasmid DNA constructions with the fragments of interest with the enzyme EcoRI, Lanes: 1: marker size of 1.0 kb; 2: *glaA* gene 1900 bp; 3: *glaA* promoter regions 600 and 200 bp; 4: *SBD* gene 300 bp. B) RT-PCR amplification of the *SBD* gene. Lanes: 1, marker size of 1.0 kb; 2, PCR of SBD using genomic DNA as template; 3, transcripts of SBD using starch as a carbon source; 4, transcripts of SBD using glucose as a carbon source; 5, the positive control *GAPDH* gene.
Figura 6. Análisis moleculares de la glucoamilasa HDP-2.

To gather more evidence of the presence of the enzyme under non-induction conditions, total RNA was extracted for use in RT-PCR.

As can be seen in ure 6, there was amplification in the RT-PCR from the RNA extracted from mycelium grown in glucose, which allows us to relate the presence of the enzyme in a non-inducing medium and suggests that its synthesis was deregulated.

DISCUSSION

The *A. niger* strain characterized as HDP-2 was isolated while looking for a microorganism with amylolytic capacity. In this work, several interesting growth characteristics were confirmed, such as its ability to grow at a pH and temperature outside the range previously reported for other strains of the same species. In addition, a concerning feature of this strain is the fact that the glucoamylase enzyme was synthesized even in a non-inducing medium; this is indicated by the detection of glucoamylase activity in media with glucose as a unique carbon source or a mixture of glucose and starch medium, where there should be catabolite repression.

The kinetics of the glucoamylase produced by *A. niger* HDP-2 were further investigated. In sum, it was confirmed that the optimum temperature for enzyme activity is 70 ºC and the optimum pH is 3. When determining the apparent values of K_m and V_{max}, in particular, K_m was like those previously reported by other authors (See Table 3; Arica *et al*., 2000; Bahar and Çelebi, 2000, Silva *et al*., 2005; Riaz *et al*., 2012; He *et al*., 2017; Banerjee and Ghosh, 2017), but V_{max} was far below the reported data. This is because our data were calculated using Andrews kinetic model, which takes kinetic substrate inhibition behavior into account. With this method, a relatively low K_i value was obtained, which is directly related to the low V_{max} result. However, it is necessary to carry out more tests to confirm these values and purify the enzyme to obtain the real values.

Regarding molecular analysis, comparing the sequences of *glaA*, part of the promoter of *glaA*, and the *SBD* of the HDP-2 strain with those reported in the NCBI using Nucleotide BLAST, no differences were found, especially in the *creA* boxes that are directly related to catabolite repression by carbon sources (See Supplementary Table 3; Verdoes *et al*., 1994; Zhong *et al*.,1994; Pel, *et al*., 2007). These results strongly suggest that the synthesis of glucoamylase is deregulated, probably related to changes in some other gene that regulates its expression, such as the *creA* gene or transcription factors of the *Amy* family.

Another possible explanation is that the positive regulation by the presence of glucose 6-phosphate on the *CreA* gene could be affected and that the enzyme necessary for this phosphorylation could also be affected at some level of its synthesis (Strauss *et al*., 1999). In addition, the presence of extracellular enzymatic activity of glucoamylase in a medium was confirmed not only by finding glucoamylase activity in filtered culture medium once *A. niger* HDP-2 has grown, but also detecting the transcripts of the *glaA* gene by rt-PCR. It is necessary to highlight that these results, although partial due to the fact that a purified enzyme is not yet available, are encouraging to continue studying this enzymatic model and the secreting strain of this enzyme. As previously mentioned in the introduction, glucoamylases are important enzymes in the food industry, and the characteristic kinetic parameters of HDP-2 glucoamylase make it attractive for use since its optimal temperature and pH could prevent contamination by bacterial growth of the substrates that are being processed with this enzyme.

CONCLUSIONS

The glucoamylase produced by the *A. niger* strain HPD-2 is deregulated in its synthesis since the presence of enzymatic activity was verified in a non-inducing medium and said activity is greater in the medium containing glucose as a carbon source. The analysis of the sequence and comparison with the database did not demonstrate any change in the sequence of the promoter region, so it is thought that the presence of glucoamylase could be related to changes in some other gene that regulates its expression, such as *creA* gene or *Amy* family transcription factors. The apparent kinetic parameters of the enzyme (V_{max} = 6.66 mM, and K_m = 66.5 mM/min) are comparatively competitive with those reported in the literature, and its optimal activity pH and temperature values (3 and 70 °C) can be an important advantage to reduce the risk of microbial contamination in industrial hydrolysis processes.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. Luis David Patiño Hernandez for the donation of *A. niger* HPD-2.

To Dr. Lorenzo Guevara Olvera (RIP), our teacher and initiator in science.

CONFLICTS OF INTEREST

The author declares that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Abarca, M.L. 2000. Taxonomía e Identificación de Especies Implicadas en la Aspergilosis Nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología. 17(3), S79-S84.

An, X., Ding, C., Zhang, H., Liu, T., and Li, J. 2019. Overexpression of amyA and glaA substantially increases glucoamylase activity in *Aspergillus niger*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 51(6), 638-644. https://doi.org/10.1093/abbs/gmz043

Andrews, J.F. 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnology and Bioengineering. 10, 707-723. https://doi.org/10.1002/bit.260100602

Arica, M.Y., Yavuz, H., Patir, S., and Denizli, A. 2000. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 11,127-138. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00223-X

Bahar, T., and Çelebi, S.S. 2000. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). Enzyme and Microbial Technology. 26: 28–33. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00129-5

Baker, S.E. 2006. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. Medical Mycology. 44(s1), 17-21. https://doi.org/10.1080/13693780600921037

Banerjee S., and Ghosh U. 2017. Production and characterization of glucoamylase by *Aspergillus niger*. Applied Food Biotechnology, 4 (1):19-26

Baltazar-Ramírez, J. 1984. Estudio cinético preliminar de una cepa de *Aspergillus* sp con actividad amilolítica. Tesis de licenciatura en ingeniería en biotecnología. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias.

Behera, B.C. 2020. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. Critical Reviews in Microbiology. 46(6), 727–749. https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815

Berka, R.M., Dunn-Coleman, N.S., and Ward, M. 1992. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In Aspergillus: biology and industrial applications. J.W. Bennett, M.A. Klich (eds), pp 155–202. Butterworth-Heinemann. London. ISSN : 0740-7378

Bertoldo, C., and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 6, 151-160. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00311-3

Bui, D.M., Kunze, I., Forster, S., Wartmann, T., Horstmann, C., Manteuffel, R., and Kunze, G. 1996. Cloning and expression of an *Arxula adeninivorans* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 44, 610-619. https://doi.org/10.1007/BF00172493

Cairns, T.C., Barthel, L., and Meyer, V. 2021. Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. Essays in Biochemistry. 65(2), 213-224. https://doi.org/10.1042/EBC20200139

Cairns, T.C., Nai, C., and Meyer, V. 2018. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. Fungal Biology and Biotechnology. 5(13), 1-14. https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5

Carballo y Melgarejo, M. 1986. Sistema amilolítico de *Aspergillus niger* HPD-2: Factores que afectan su producción y actividad. Tesis de Maestría en ingeniería bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

Cervantes-Montelongo, J.A. 2009. Amplificación de los ITS´s del ADNr 5.8S para la identificación dos aislados, uno de residuos de tenería y otro potencialmente sobreproductor de glucoamilasa. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. México.

Ceseño-Gamez, A. 1988. Producción de amilasa por *Aspergillus niger* HPD-2 en Cultivo sumergido con harina integral de yuca. Tesis de maestría en ciencias en ingeniería bioquímica. Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

de Assis, L.J., Pereira Silva, L., Bayram, O., Dowling, P., Kniemeyer, O., Krüger, T., Brakhage, A. A., Chen, Y., Dong, L., Tan, K., Wong, K.H., Ries L.N.A., and Goldman, G.H. 2021. Carbon catabolite repression in filamentous fungi is regulated by phosphorylation of the transcription factor CreA. ASM Journals mBio 12(1). https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mbio.03146-20

Dowzer, C., and Kelly, M.J. 1991. Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology 11, 5701-5709. https://doi.org/10.1128/mcb.11.11.5701-5709.1991

EFSA CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids), Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I-L., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Aguilera, J., Andryszkiewicz, M., Liu, Y., di Piazza, G., Rainieri, S. and Chesson, A. 2023. Scientific Opinion on the safety evaluation of the food enzyme catalase from the non-genetically modified *Aspergillus niger* strain CTS 2093. EFSA Journal 2023; 21(2):7843, 16 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7843

Grassin, C. and Fauguenbergue, P. 1999. Enzymes, fruit juice processing. In: Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation, M.C. Flickinger and S.W. Drew (eds) Wiley & Sons, Inc, New York. https://doi.org/10.1002/0471250589.ebt083.

He L., Mao Y., Zhang L., Wang H., Alias S.A., Gao B. and Wei D. 2017. Functional expression of a novel α-amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. BMC Biotechnology (2017) 17:22. DOI 10.1186/s12896-017-0343-8.

Henrissat, B. 1991. A Classification of Glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochemical Journal, 280, 309-316. https://doi.org/10.1042/bj2800309

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., and Liu, S. 2020a. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. Biotechnology Advances, 107630. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107630

Li, Q., Ray, C. S., Callow, N. V., Loman, A. A., Islam, S. and Ju, L. 2020b. *Aspergillus niger* production of pectinase and

α-galactosidase for enzymatic soy processing. Enzyme and microbial technology 134: 109476. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109476

Liu, D., Liu, Q., Guo, W., Liu, Y., Wu, M., Zhang, Y., Li, J., Sun, W., Wang, X., He, Q. and Tian, C. 2022. Development of Genetic Tools in Glucoamylase-Hyperproducing Industrial *Aspergillus niger* Strains. Biology, 11(10), 1396. https://doi.org/10.3390/biology11101396

Lima, M.A.S., de Oliveira, M.C.F., Pimenta, A.T.Á. and Uchôa, P.K.S. 2019. *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to Natural Products Chemistry. Journal of the Brazilian Chemical Society. 30(10), 2029-2059. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190080

Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. The Lowry method for protein quantification. J. Biol. Chem, 193, 265-275.

MacGregor, E.A., Janecek, S. and Svensson, B. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. 1546, 1-20. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00302-2

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry. 31, 135-152. doi:10.1042/ba19990073

Papadaki, E. and Mantzouridou, F. T. 2023. Application of *Aspergillus niger* for extracellular tannase and gallic acid production in non-sterile table olive processing wastewaters. Waste And Biomass Valorization (2023). https://doi.org/10.1007/s12649-023-02242-0

Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., *et al*. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88. Nature biotechnology, 25(2), 221-231.

Riaz M., Rashid M.H., Sawyer L., Akhtar S., Javed M.R., Nadeem H., and Wear M. 2012. Physiochemical properties and kinetics of glucoamylase produced from deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus niger* for soluble starch hydrolysis. Food Chemistry. 1; 130(1): 24-30. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.037.

Rippel-Baldes, A. 1955. Grundzüge der Mikrobiologie. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, P. and van Dijck, P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* a review. Applied Microbiology and Biotechnology. 59, 426-435. https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6

Silva, R.N., Asquieri, E.R. and Fernandes, K.F. 2005. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. Process Biochemistry. 40, 1155-1159. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.006

Strauss, J., Horvath, H. K., Abdallah, B. M., Kindermann, J., Mach, R.L. and Kubicek, C. P. 1999. The Function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. Molecular Microbiology. 32(1), 169-178. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01341.x

Verdoes, J. C., Punt, P. J., Stouthamer, A. H., and van den Hondel, C. A. 1994. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the Aspergillus niger glucoamylase-encoding gene. Gene, 145(2), 179-187.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Noé-Aguilar, C., Romero-Gómez, S., Diaz- Godínez, G. and Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal. 13, 157-167. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6

Yu, R., Liu, J., Wang, Y., Wang, H. and Zhang, H. 2021. *Aspergillus niger* As A Secondary Metabolite Factory. Frontiers In Chemistry 9. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.701022

Zong, X., Wen, L., Wang, Y. and Li, L. 2022. Research progress of glucoamylase with industrial potential. Journal of Food Biochemistry, 46, e14099. https://doi.org/10.1111/jfbc.14099

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Summary of the characteristics of the amylolytic system of *A. niger* HPD-2 (Carballo y Melgarejo, 1986).

Characteristic	Crude extract	Extract purified by evaporation	Extract purified by chromatography
Optimum temperature	60 °C	---------	70 °C
Optimum pH	3	---------	4
Ea (reaction)	$1.41*10^4$ cal/mol	---------	$1.03*10^3$ cal/mol
Ea (inactivation)	$1.82*10^4$cal/mol	---------	$4.39*10^4$ cal/mol
K_m	0.38mg/mol	---------	0.38 mg/mL
V_{max}	1.81 mg Az. Red./mL*min	---------	0.74 mg Az. Red./ mL*min
Number of bands in polyacrylamide gel	7	2	----------

Supplementary Table 2. Glucoamylase activity values per mg dry weight and per mL in filtrates from different rich culture media.

Culture media	Time (h)	Activity by dry weight mg (E-03)	Total activity (E-03)
Dextrose Sabouroad	12	3.50	2.80
	24	0.88	2.80
	36	3.50	18.15
Maltose Sabouroad	12	0.50	0.30
	24	4.10	8.20
	36	25.00	91.10
YPG	12	5.70	12.90
	24	0.60	2.80
	36	0.093	0.80

Supplementary Table 3. Summary of sequence analysis for g*laA* gene, *glaA* promoter, and SBD *gaA2* clones from *A. niger* HDP-2.

Sample	Access	Identifier	E	I	Reference
glaA	XM_001390493.2	*Aspergillus niger* CBS 513.88 glucoamylase, mRNA	2E-144	100 %	Pel, *et al*., 2007
Promoter *glaA*	Z30918.1	*Aspergillus niger* (N402) glucoamylase gen (Promoter region)	0.0	100 %	Verdoes *et al*., 1994
SBD g*laA2*	XM_001390493.2 AY250996.1	*Aspergillus niger* CBS 513.88 glucoamylase, mRNA	1E-147	100 %	Zhong *et al*.,1994

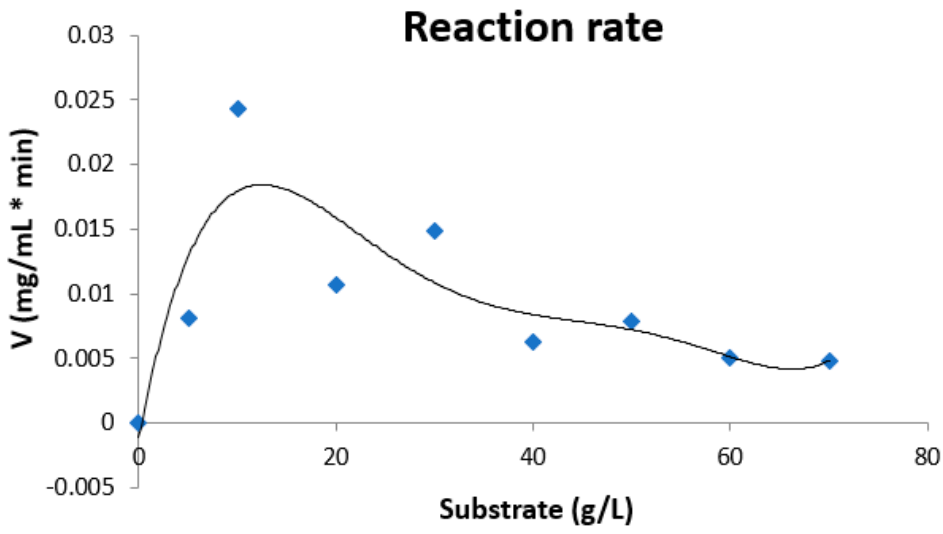
E= E value, I= percent identity

Calculation of apparent K_m and V_{max}

Linear regressions of glucoamylase enzyme kinetics with different substrate concentrations, reaction rates were obtained.

Reaction rate values from HDP-2 glucoamylase kinetics at different substrate concentration and polynomial regression

Substrate concentration (g/L)	Reaction rate (mg/mL*min) E-03
0	0
5	8.1
10	24.3
20	10.7
30	14.9
40	6.2
50	7.9
60	5.0
70	4.8



The results shown in the graph do not couple with a Michaelis-Menten kinetics. The points indicate the experimental kinetic rate values, while the line is a third degree-polynomial approximation.
The Kinetic Model of Andrews (1968) was chosen to calculate the K_m and V_{max} apparent values; the experimental data obtained using partially purified extract on different substrate concentration was compared with the calculated model predictions, this by using the Solver Excel tool to minimize the error.

Kinetics Andrews model

$$V = \frac{V_{max}\ S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

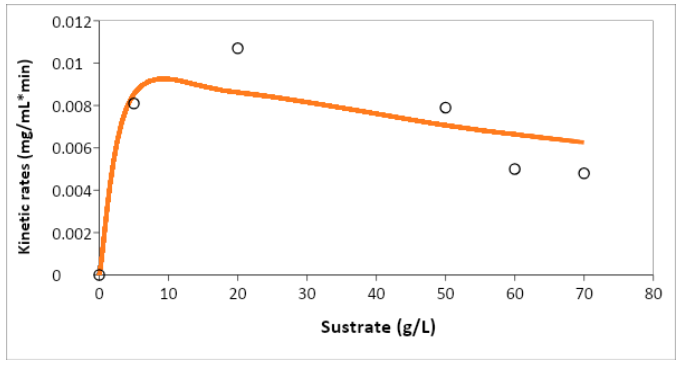
Comparison of HDP-2 glucoamylase kinetics rates of experimental and calculated values with the Andrews model.

Experimental substrate (g/L)	V_{exp} (mg/mL * min)	V_{cal} (mg/mL * min)	$(V_{exp} - V_{cal})^2$
0	0	0	0
5	0.0081	0.008551291	2.03663E-07
20	0.0107	0.008611407	4.36222E-06
50	0.0079	0.00706798	6.92257E-07
60	0.005	0.006640006	2.68962E-06
70	0.0048	0.006257172	2.12335E-06
		Squared error	1.00711E-05

V_{exp}, V experimental; V_{cal}, V calculated. The squared error is displayed.

Calculated values	V_{max} (mg mL^{-1}min^{-1})	K_m (g L^{-1})	K_i (g L^{-1})
Andrews model	0.0108	1.08	97.56
	V_{max} (mg mL^{-1}min^{-1})	K_m (g L^{-1})	

Circles represent the experimental data and solid line represents the fit to the Andrews Model.
The K_m and V_{max} apparent values obtained with the Andrews Model:



Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Propiedades fisicoquímicas y bioactivas de películas comestibles basadas en alginato y miel melipona

Physicochemical and bioactive properties of edible films based on alginate and melipona honey

Emir Hernández Gómez[1], Tomás J. Madera-Santana[2]* ✉, Patricia Quintana-Owen[3], Elizabeth Ortiz Váz-quez[1], Jesús M. Ramón Sierra[1], María de Lourdes Vargas y Vargas[1]* ✉

[1] Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida.
[2] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, 83304, México.
[3] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida, 97310 Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN

Las películas comestibles (PCs) presentan una alternativa para incrementar la vida útil de frutas y hortalizas al servir como barrera para la transferencia de oxígeno y humedad; y al mismo tiempo, permitir la liberación de compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana hacia el alimento. En el presente estudio se formuló y caracterizó películas a base de alginato de sodio (A) a distintas concentraciones de miel de melipona (M). Las PCs se formularon con una concentración de 2 % de A y 6 concentraciones diferentes de M (0 hasta 1.6 % p/v) y se les evaluó las propiedades físicas, de barrera, mecánicas, ópticas, estructurales, morfológicas y bioactivas. En las propiedades físicas, las películas presentaron un incremento en el espesor y la densidad, y una disminución en el porcentaje de humedad al incrementar el contenido de miel. Las PCs mostraron un efecto plastificante observado en la mayor concentración de M reflejando un aumento de hasta 9 % en el porcentaje de elongación, una disminución en el esfuerzo a la tensión y módulo elástico de 18.36 MPa y 283.88 MPa, respectivamente. La formulación con 1.6 % de M mostró las propiedades fisicoquímicas adecuadas y propiedades plastificantes para ser usada como PCs.

Palabras clave. Alginato, miel, película comestible, innovación, agente plastificante.

ABSTRACT

Edible films (EFs) present an alternative to increase the shelf life of fruits and vegetables by serving as a barrier for the transfer of oxygen and moisture; and at the same time, to allow the release of compounds with antioxidant and antimicrobial activity into the food. In the present study, films based on sodium alginate (A) were formulated and characterized at different concentrations of melipona honey (M). The EFs were formulated with a concentration of 2 % A and 6 different concentrations of M (from 0 to 1.6 % w/v) and their physical, barrier, mechanical, optical, structural, morphological, and bioactive properties were evaluated. The physical properties of the films showed an increase in thickness and density and a decrease in the percentage of moisture with increasing honey content. The EFs showed a plasticizing effect observed at the highest concentration of M, reflecting an increase of up to 9 % in the percentage of elongation, a decrease in tensile strength, and elastic modulus of 18.36 MPa and 283.88 MPa, respectively. The formulation with 1.6 % M showed suitable physicochemical and plasticizing properties to be used as EFs.

Keyword: Alginate, honey, edible films, innovation, plasticizing agent**.**

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la industria alimentaria ha sufrido cambios en términos de sostenibilidad y efectividad en el envasado de alimentos. Los envases plásticos en los alimentos son la principal causa de contaminación en el ambiente y representan el 50% de contaminación a nivel global (Ncube *et al*., 2021). Una alternativa innovadora para hacer frente a este problema es el uso de envases y películas comestibles (PCs) biodegradables. Las PCs se basan de polímeros naturales renovables, los cuales proporcionan una capa protectora a los productos vegetales o cárnicos frescos, lo que aumenta la vida útil al retrasar el deterioro del producto; ya que actúan como barrera contra la humedad y el oxígeno. Además, representan una alternativa para sustituir a los envases plásticos; sin embargo, la efectividad de estas películas depende en gran parte de las propiedades mecánicas y de barrera que posean.

Los biopolímeros que se emplean en las PCs son polisacáridos, lípidos y proteínas; los cuales forman una matriz transparente, delgada y comestible (Salama y Aziz, 2020). Estos biopolímeros son solubilizados, vertidos en un recipiente y secados para formar una película delgada; la cual posteriormente, puede dar forma de bolsa para contener un alimento. Esta película evita la pérdida de peso de un vegetal durante el almacenamiento y además pueden contener compuestos activos (antimicrobianos y antioxidantes) para extender la conservación del alimento (Abdel y Salama, 2021a). Entre los polisacáridos, el alginato obtenido a partir de las algas pardas marinas, forman PCs y recubrimientos comestibles (RCs) fácilmente, debido a sus propiedades coloidales únicas, biodegradabilidad y bioadhesividad (Pereira *et al*., 2011). Existen investigaciones de la aplicación del alginato en PCs y RCs de alimentos. Tapia *et al*. (2007) reportaron que películas de alginato poseen una mayor resistencia para disolverse en

*Authors for correspondence: María de Lourdes Vargas y Vargas y Tomás J. Madera-Santana
e-mail: madera@ciad.mx; maria.vy@tecnm.mx
Recibido: 26 de abril de 2023
Aceptado: 29 de noviembre de 2023
Publicado: 6 de diciembre, 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2028

agua, por lo éstas tienen potencial de recubrir frutas recién cortadas con alta humedad. Las películas de alginato son insípidas, resistentes al aceite e inodoras (Theagarajan *et al*., 2019); sin embargo, estas PCs carecen de propiedades mecánicas, de barrera, antioxidantes entre otras (Abdel *et al*., 2018). Estas propiedades son necesarias para la proteger y conservar el alimento. No obstante, la adición de otros componentes permite mejorar sus propiedades al ser aplicados en alimentos. La incorporación de aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) y sábila *Aloe vera* L. en películas de alginato de sodio mejoraron las propiedades térmicas y mecánicas, se redujo la permeabilidad al vapor de agua; al ser aplicado como recubrimiento en tomates se logró incrementar la vida útil (Abdel *et al*., 2018).

Por otra parte, la miel de melipona proveniente de la península de Yucatán, México es producida por la abeja *Melipona beecheii*, y es preferida por la población a comparación de la miel de *Apis mellifera* (Castillo *et al*., 2016). Esta miel cuenta con propiedades bioactivas, curativas, fisicoquímicas y antibacterianas; las cuales se deben a la composición típica de sus azúcares simples (glucosa y fructosa), aminoácidos, lípidos, proteínas y lactobacilos (Zarei *et al*., 2019). En la literatura, no se halla reportado el uso de la miel melipona como agente plastificante en PCs basadas en alginato.

Por lo anterior, en este trabajo se han realizado distintas mezclas del alginato con un agente activo, como la miel, para producir PCs; contemplando que la miel de melipona pueda actuar como plastificante, agente antioxidante y antimicrobiano. El objetivo de este trabajo es desarrollar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de películas basadas en alginato y diferentes concentraciones miel melipona; las cuales, puedan emplearse eventualmente en la conservación de alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó alginato de sodio (A) de medio peso molecular y aditivo grado alimenticio de la marca Deiman S.A. de C.V. (Ciudad de México) con alta tasa de solubilidad. La miel de melipona producida por la abeja *Melipona beecheii*, la cual fue colectada de un apiario rural en la población de Maní, Yucatán, México (20.385444114994154 N, - 89.39841799586078 O) en el mes de marzo del 2021. Las formulaciones se elaboraron a partir de diferentes concentraciones de miel melipona (M) manteniendo constante la concentración de A, como se presentan en la Tabla 1. Las PCs se realizaron mediante la técnica de solución-vaciado en placa (casting). El A al 2 % p/v se solubilizó en agua destilada durante 4 h de agitación a 60 °C. Posteriormente, a la solución de A se adicionó la solución de M a las diferentes concentraciones, la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a la misma temperatura. La solución filmogénica se vació en cajas Petri y se secaron a 60 °C durante 24 h en una estufa de convección marca Binder modelo ED115 (Tuttlingen, Alemania). Las películas formadas se retiraron de los moldes manualmente y se almacenaron en un desecador y a la obscuridad, esto es para evitar la ganancia o pérdida de humedad y que la luz natural afecte los compuestos activos presentes en la película.

Tabla 1. Formulaciones de las películas elaboradas.
Table 1. Formulations of the films prepared.

Código de película	A (% p/v)	M (% p/v)
A	2	0
AM.2	2	0.2
AM.4	2	0.4
AM.8	2	0.8
AM1.2	2	1.2
AM1.6	2	1.6

Alginato (A), miel melipona (M). Volumen de solución 100 mL.

Caracterización de las películas

Espesor y densidad aparente

El espesor de las películas se midió en seis puntos aleatorios, a temperatura ambiente con un micrómetro digital marca Mitutoyo modelo H2780 (Aurora, IL) con una precisión de ± 0.001 mm. Se reportó el valor promedio del espesor ± la desviación estándar en mm. En una balanza analítica, se determinó el peso de cada película con medidas de aproximadamente 4.0 cm^2 y se calculó el volumen para hallar la densidad aparente (g/cm^3).

Humedad

El contenido de humedad de las películas fue determinado por gravimetría, se pesaron muestras cuadradas de 4.0 cm^2 de las películas en una balanza analítica modelo Adventure, marca Ohaus Corp. (Parsippany, NJ). Posteriormente, éstas fueron colocadas en una estufa de convección a 80 °C por 24 h, para después ser enfriadas en un desecador y registrar su peso de nuevo. El porcentaje de humedad se calcula por diferencia de peso mediante la siguiente Ecuación 1.

$$\%\, humedad = \frac{W_0 - W_f}{W_0} x100 \quad (1)$$

Donde W_0 es el peso inicial y W_f es el peso seco de las películas después del secado.

Velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA)

Los ensayos de VTVA fueron realizados mediante el método ASTM E96/E96M, con modificaciones realizadas por Chan *et al*. (2021). Un recipiente conteniendo 30 mL de agua destilada, en cuya tapa se colocó la muestra de PC. El espacio de cabeza entre la muestra y el agua genera la humedad relativa (vapor de agua saturada), el recipiente cerrado se almacenó a 27 °C en un desecador y se tomó el peso del recipiente cada 2 h hasta completar 12 h de registro. La VTVA se calculó de acuerdo con la siguiente Ecuación 2.

$$VTVA = \frac{b}{A} \quad (2)$$

Donde b es la pendiente de la recta (g/h) del gráfico diferencia de peso vs tiempo y A es el área de transferencia de la película (m^2).

Propiedades ópticas

Opacidad

Los valores de transmisión de luz de las películas se obtuvieron mediante los resultados de la medición de la transmitancia de las longitudes de onda seleccionadas entre 200 y 800 nm, empleando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Cary 50 de la marca Varian, Inc. (Walnut Creek, CA). Las películas se recortaron en rectángulos de 40 x 10 mm y se colocaron en la celda del espectrofotómetro, utilizando la celda libre de cualquier sustancia como blanco de calibración. La opacidad se determinó por la medida de la absorbancia a 600 nm con espectrofotómetro UV-Vis y calculada por la Ecuación 3.

$$O = \frac{Abs_{600}}{\delta} x100 \quad (3)$$

Donde *O* es el % de opacidad, Abs_{600} es el valor de absorbancia a 600 nm, δ es el espesor de la película (mm).

Color

El color de los recubrimientos se determinó empleando un colorímetro X-rite, modelo SP62, marca X-Rite, Inc. (Grandville, MI), calibrado con un mosaico estándar (Y = 94.05333, x = 1.1366667, y = - 4.36) y una referencia del rango de opacidad (5.32 %). Evaluando las muestras experimentadas con los parámetros de color empleando la escala del CIELab, siendo éstos la luminosidad (*L**), el valor de *a** (rojo-verde) y *b** (amarrillo-azul); calculando la cromaticidad (*C**) y el ángulo Hue (°Hue). Las mediciones se realizaron en 8 puntos de cada una de las muestras. La diferencia total de color (ΔE), se determinó tomando como referencia estándar la película control (solamente alginato, A). Los parámetros ΔE, °Hue y *C** fueron calculados a partir de las Ecuaciones 4, 5 y 6:

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

$$^\circ Hue = \left[\arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)\right] \quad (6)$$

Donde *L** es el valor de luminosidad, *a** valores rojo-verde, *b** valores amarillo-azul y L_0, a_0, b_0 son valores de la película control.

Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas se realizó de acuerdo al método ASTM D882. Las muestras fueron cortadas en rectángulos de 60 x 10 mm. Para las pruebas mecánicas a tensión se utilizó una máquina universal de pruebas mecánicas marca Instron modelo 4442 (Canton, MA). Se midió el espesor de la película empleando un micrómetro digital marca Mitutoyo modelo H2780 (Aurora, IL) con una precisión de ± 0.001 mm, en la parte central del rectángulo para calcular su área transversal. A los extremos, se le colocaron cinta adhesiva para evitar el desgarre la película entre mordazas. El ensayo a tensión se utilizó una celda de carga de 50 kg y la separación entre mordazas fue de 30 mm con una velocidad de estiramiento de 5 mm/min. La resistencia a la tensión, el porcentaje de elongación a la ruptura y el módulo de elasticidad se determinaron a partir de los datos de fuerza y desplazamiento registrados durante el ensayo de cada una las muestras. Se realizaron 5 mediciones por cada muestra. Los parámetros mecánicos registrados fueron la resistencia a la tensión (RT), porcentaje de elongación a la ruptura (% Er) y módulo de elasticidad (ME) se utilizaron las siguientes Ecuaciones 7, 8 y 9.

$$RT = \frac{F_{max}}{At} \quad (7)$$

$$\%Er = \frac{L_f - L_i}{L_i} x100 \quad (8)$$

$$ME = \frac{f}{At} x \frac{1}{\epsilon} \quad (9)$$

Donde: F_{max} es la fuerza máxima a la ruptura (N), *At* es el área transversal de la muestra (mm^2), L_f es la longitud final (mm), L_i es la longitud inicial (mm), *f* es la fuerza en (N) correspondiente al esfuerzo y ϵ = es la deformación correspondiente al esfuerzo.

Análisis morfológico

La morfología de la superficie de los recubrimientos fue caracterizada usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Phillips XL 30 ESEM (Hillsboro, OR). Previo al análisis, las películas se montaron en un porta muestras cilíndrico de 10 mm de diámetro con cinta adhesiva conductora de carbono de doble cara. Posteriormente, las muestras se recubrieron con una capa fina de Au-Pd usando un recubridor de plasma marca Quorum modelo QI5OR-(Sussex, UK) antes de su análisis. La morfología de la superficie se observó en muestras de 5 x 5 mm, la magnificación de 200x fue utilizada para observar la superficie de las PCs.

Análisis estructural

Los espectros de infrarrojo de las PCs se obtuvieron de un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)de la marca Thermo Scientific™ modelo Nicolet™ iS50™ utilizando la técnica ATR (Attenuated Total Reflection). Los espectros se registraron en el intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1}, una velocidad de exploración de 0.675 cm^{-1}/s y después de 100 barridos.

Propiedades bioactivas

Contenido fenoles totales

Mediante la técnica de Folin-Ciocalteu se determinó el contenido de fenoles totales, propiedad basada en la reacción de los o-fenoles en presencia de agentes oxidantes (Cruzado *et al*., 2013). Un g de cada recubrimiento se colocó en tubos de ensayo y se le añadieron 9 mL de agua destilada, después 2 h se le agregó nuevamente 4 mL de agua destilada. Posteriormente, las muestras se introdujeron en un sonicador modelo UP200st de la marca Hielscher USA, Inc. (Wanaque, NJ) a 31

ºC durante 30 min. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 765 nm, para la obtención de los resultados se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 0 a 0.5 mg/mL, usando ácido gálico como estándar. El resultado es expresado como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra (mg EAG/100 g de muestra).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las PCs formuladas se realizó mediante el método del ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio) descrito por Re *et al*. (1999). Los resultados se expresaron como % de inhibición de radicales libres mediante la Ecuación 10.

$$\%\ inhibición = \frac{ABTS_0 - ABTS_f}{ABTS_0} x100 \quad (10)$$

Donde $ABTS_0$ es la absorbancia a 734 nm y $ABTS_f$ es la absorbancia a 734 nm después de 7 min.

Análisis estadístico

Los resultados de los análisis físicos, mecánicos, ópticos, de barrera y bioactivas se realizaron por triplicado y se sometieron al análisis de varianza de una vía (ANOVA), mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer empleando un nivel de significancia (α) del 5 %. se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurión (The Plains, VA). Los resultados se presentan como el valor promedio ± la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Espesor y densidad

El espesor es un parámetro para considerar ya que de éste dependerá que se forme adecuadamente la PC o el RC sobre el alimento. Los espesores de las películas formuladas presentaron diferencias significativas entre las concentraciones ($p \leq 0.05$), el rango de espesor fue de 0.03 a 0.07 mm (Tabla 2). Las PCs que contienen miel presentaron un incremento en el espesor, siendo las formulaciones AM1.2 y AM1.6 las que obtuvieron un valor mayor de espesor. Esto se atribuye a la existencia de una relación entre el grosor y la cantidad de solutos incorporados en la película. El espesor de una película es un factor importante en el intercambio de agua y gases con el ambiente, a mayor grosor menor será la tasa de difusión (García *et al*., 2019). Chen *et al*. (2018) reportaron una relación directa entre espesor y sólidos en recubrimientos a base de quitosano-zeína producidos por plasma frío. Joshi *et al*. (2014) mencionan que la variación de espesores de las películas puede ser muy amplio, ya que depende tanto de las condiciones del procesamiento como de la composición.

Tabla 2. Valores de espesor, densidad, contenido de humedad y opacidad de las PC formuladas*.
Table 2. Thickness, density, moisture content, and opacity values of the formulated EFs*.

Muestra	Espesor (mm)	Densidad (g/cm³)	Humedad (%)	Opacidad (mm^{-1})
A	0.03 ± 0^{a}	0.14 ± 0.03^{a}	40.98 ± 7.85^{a}	1.53 ± 0.03^{a}
AM.2	0.02 ± 0^{b}	0.28 ± 0.07^{b}	19.18 ± 6.64^{b}	1.73 ± 0.03^{b}
AM.4	0.03 ± 0.01^{ca}	0.34 ± 0.03^{c}	13.27 ± 4.41^{c}	1.37 ± 0.02^{c}
AM.8	0.04 ± 0^{d}	0.31 ± 0.08^{d}	13.56 ± 3.03^{cd}	1.47 ± 0.02^{acd}
AM1.2	0.07 ± 0.02^{e}	0.21 ± 0.09^{e}	13.07 ± 2.01^{cde}	1.02 ± 0^{e}
AM1.6	0.07 ± 0^{fe}	0.29 ± 0.06^{f}	14.58 ± 2.27^{df}	1.11 ± 0^{ef}

* Valor promedio ± desviación estándar. Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En cuanto a la densidad de las PCs, los resultados presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), encontrándose la misma relación que en el espesor, siendo la PC de A la que presentó una menor densidad, a diferencia de las PCs de AM.4 y AM.8, las cuales presentaron valores de densidad mayores en función del contenido de sólidos presentes en la miel. Dhanapal *et al.* (2012) comentaron que, para asegurar la estabilidad de las películas, se requiere tener una apropiada densidad con el fin de que se mantenga la integridad estructural al recubrir el alimento.

Humedad

El contenido de humedad de las PCs disminuyó al añadirse la miel a la matriz de alginato, esto se refleja en las interacciones entre el alginato y la miel. La disminución del contenido de humedad de las PCs se debe a que la miel en el alginato promueve una disminución de la disponibilidad de grupos hidroxilo (-OH) y C-H, limitando las interacciones (alginato-agua) a través de enlaces de hidrógeno (Ore *et al*., 2020). Rodríguez *et al*. (2014) reportaron este comportamiento en películas basadas de quitosano y alcohol polivinílico (PVA), indicaron la formación de enlaces de hidrógeno entre el plastificante y las moléculas de agua, las cuales disminuyen la capacidad de retener agua por la película.

Tasa de transmisión al vapor de agua

La transmisión al vapor de agua (TVA) es de los parámetros de mayor importancia en la caracterización de las PCs, tiene como objetivo optimizar el ambiente de los productos alimenticios e incrementar la vida útil. En cuanto a la tasa de TVA de las películas formuladas, en la Figura 1 se observa que los valores significativamente mayores ($p < 0.05$) corresponden a las formulaciones AM1.2 y AM1.6; mientras que las películas A y AM.2 presentaron los valores menores de TVA. Estos resultados presentan una relación directa con el espesor y el contenido de miel. Al incrementar el espesor de la PC, hay un aumento en la resistencia para la transferencia de masa de la presión parcial del vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la PC; es decir aumenta la propiedad de barrera del vapor de agua de la película. Algunos autores han reportado un efecto contrario en el cambio del espesor y atribuyen que el incremento de la TVA se debe a los cambios en la estructura de la película debido al hinchamiento producido por el vapor de agua (Ramos *et al*., 2018). Por otra parte, la miel es altamente hidrofílica y presenta determinada compatibilidad con el alginato, debido a que aumenta la capacidad de absorción de molécula polares como el agua,

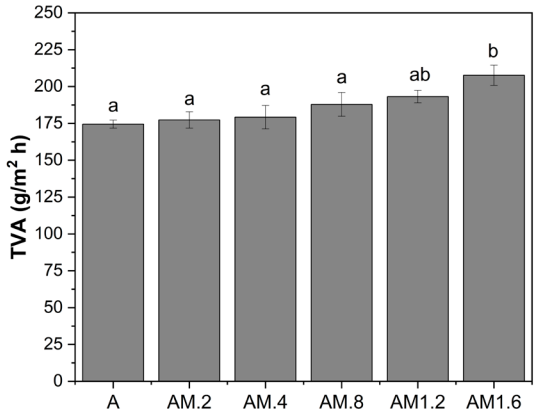


Figura 1. Valores de TVA de los PCs a diferentes concentraciones de miel. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa entre las formulaciones ($p < 0.05$).
Figure 1. WVTR values of EFs at different honey concentrations. Different letters in each column indicate significant differences between formulations ($p < 0.05$).

incrementando la permeabilidad al vapor de agua. Además, este componente actúa como plastificante, disminuye las fuerzas intermoleculares en las cadenas del alginato, dando una mayor movilidad y el espacio molecular entre las cadenas, aumentando su permeabilidad al agua.

Opacidad

La opacidad es una propiedad de calidad de gran importancia, particularmente cuando se emplea una película o un recubrimiento sobre un alimento, debido a que éstas actúan como un catalizador para evitar la oxidación y degradación de sus diversos compuestos nutricionales. La adición de diferentes componentes en las PC o RC tienden a absorber luz ultravioleta y visible, y actúan como una barrera a estas zonas del espectro electromagnético (Solano *et al*., 2018). La opacidad de las PCs analizadas presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) como se muestran en la Tabla 2; sin embargo, la película AM.2 mostró el mayor % de opacidad a comparación de las demás. Lo cual podría atribuirse a que presentó una mayor interacción con la región de UV-Vis de esta formulación en particular. Por otro lado, se observa que al incrementar el contenido de miel se observa una disminución en el valor de opacidad, esto podría indicar que la región de la absorbancia de 600 nm (color amarillo-naranja) no interacciona en las PCs con mayor contenido de miel (AM1.2 y AM1.6). Rojas & Tim (2016) mencionan que el aumento de la opacidad puede ser efecto de una biodegradación térmica, debido a la reducción del factor de luminosidad, lo cual indica que la muestra, al ser expuesta a una ligera degradación térmica reduce su luminosidad y aumenta su opacidad.

Color

Uno de los parámetros importantes para determinar cambios en las PCs, es el color (Nouraddini *et al*., 2018). En la escala CIELab (L^*, a^* y b^*), parámetros cuantitativos del color de un material que visualmente no se puede diferenciar; es por ello, que es ampliamente utilizada para determinar el color de una película o material (Bodor *et al*., 2021). El efecto de las distintas concentraciones de miel en las PCs se presenta en la Tabla 3. Mediante los parámetros de color, se determinó la diferencia de color (ΔE), el ángulo (°Hue) y la cromaticidad (C^*); las cuales presentaron variación en sus valores en función de las diferentes concentraciones de miel.

En la Tabla 3 se presentan los valores de L^* de las muestras. Se puede observar una tendencia a disminuir el valor de L^* al incrementar el contenido de miel en las PCs. Sin embargo, las películas AM.4 y AM.8 muestran lo contrario, aunque estos valores no presentan diferencia significativa con la película de A (control) ($p > 0.05$). García *et al.* (2019) mencionan que los valores promedio de la luminosidad en distintas PCs presentan una tendencia similar al aumentar su grosor, disminuyendo su luminosidad.

En cuanto a la diferencia de color (ΔE) cuyos valores se muestran en la Tabla 3, la PC de A fue la que se empleó con los parámetros de color iniciales (L_0^*, a_0^*, b_0^*). La PC que presentó la mayor diferencia de color fue la AM1.6 ($p < 0.05$), debido a su mayor concentración de miel. En tanto la que presentó menor diferencia de color fue la AM.2 ($p < 0.05$), indicando que el aumento de color va a estar influenciado directamente por el incremento en la concentración de miel en una matriz de alginato. Abdel y Salama (2021b) reportaron resultados similares utilizando alginato con la adición de sábila *Aloe vera* y aceite de ajo, obteniendo películas amarillentas y oscuras registrando un aumento de los valores del parámetro b^* y la disminución de L^*; no obstante, la transparencia de la película no se vio afectada significativamente. Es importante señalar, de que el color que presentan las PCs influirá en la conservación de las características organolépticas visuales del producto y en la aceptación del consumidor.

El °Hue representa el matiz o el grado de la tonalidad de un color, como se describen los colores (rojo-verde, azul-amarillo) en la esfera de color de CIELab (Fairchild, 2005). Los resultados del °Hue de las PCs que se presentan en la Tabla 3, presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones. La PC A presentó un mayor valor del °Hue, en contraste, la PC con mayor concentración de miel (AM1.6)

Tabla 3. Propiedades ópticas de las PC formuladas*.
Table 3. Optical properties of formulated EFs*.

Muestra	L*	ΔE*	°Hue	C*
A	59.55 ± 3.93^{a}		-48.18 ± 4.77^{a}	4.54 ± 0.29^{a}
AM.2	55.49 ± 3.01^{b}	3.53 ± 0.82^{a}	-44.25 ± 3.25^{b}	5.04 ± 0.43^{b}
AM.4	59.67 ± 0.41^{ca}	4.56 ± 0.32^{b}	-51.3 ± 14.24^{ac}	4.23 ± 0.21^{c}
AM.8	61.07 ± 0.80^{acd}	5.85 ± 0.76^{c}	-75.37 ± 6.67^{d}	4.97 ± 0.79^{abd}
AM1.2	51.93 ± 1.22^{e}	5.96 ± 0.84^{cd}	-81.09 ± 2.63^{de}	8.41 ± 0.52^{e}
AM1.6	54.50 ± 1.61^{ef}	7.53 ± 0.58^{e}	-88.68 ± 1.33^{f}	10.8 ± 0.57^{f}

* Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

presentó menor valor, siendo un valor negativo, debido a que uno de los parámetros *a** o *b** lo son. Sin embargo, se pudo observar que mayor concentración de miel, las PCs mantienen la tonalidad amarilla. Este mismo efecto, se refleja observando el valor de cromaticidad (*C**), el cual representa el grado de saturación específica. La adición de una mayor concentración de miel conduce al incremento del grado de saturación de las PCs, la cual es significativamente diferente en las formulaciones AM1.2 y AM1.6 ($p < 0.05$), notándose en estas una ligera tonalidad oscura.

Pruebas mecánicas

En la Tabla 4, se presentan los resultados de los parámetros mecánicos a tensión de las PCs formuladas. Los resultados señalan que la presencia de la miel en las PCs presenta un efecto plastificante, como lo revelan los parámetros mecánicos a tensión (esfuerzo máximo, elongación a la ruptura y módulo elástico). La PC de A presentó el mayor valor promedio de esfuerzo máximo, la adición de miel a las diferentes concentraciones ocasionó una disminución gradual en los valores de este parámetro, como se observa en las formulaciones AM1.2 y AM1.6, las cuales fueron significativamente inferiores ($p < 0.05$). La adición de hasta un 1.6 % de miel (AM1.6) en las PCs formuladas exhibieron características de plastificación en la matriz de alginato. Rocha *et al*. (2021) reportaron resultados similares, en un sistema basado en óxido de grafeno reducido, agar y miel melipona, reportando una resistencia a la tensión de 18.10 MPa, elongación a la ruptura de 21.49 % y módulo elástico de 368.13 MPa; estos autores concluyeron que la miel de melipona muestra un comportamiento plastificante en películas de agar y oxido de grafeno reducido. Con respecto a la elongación a la ruptura de las PCs formuladas, la PC A (sin miel) presentó un valor menor en comparación con la PC AM1.6, la cual fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a las PCs formuladas. Lo anterior, nos indica que la miel le imparte a la película la característica de agente plastificante, capaz de inter penetrar a través de las cadenas del biopolímero, disminuyendo las fuerzas intermoleculares y aumentando la flexibilidad de éstas (Rodríguez *et al*., 2014). En el módulo elástico (ME), parámetro relacionado con la rigidez del material a bajas deformaciones, se observa que las películas presentan una tendencia decreciente conforme la concentración de miel se incrementa, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$). Una tendencia similar ha sido reportada por Cazón *et al*. (2020) para películas de celulosa combinadas con glicerol y alcohol polivinílico con valores de ME de 227.8 MPa. La rigidez de las PCs formuladas presentó una disminución gradual conforme la concentración de miel se incrementa. Por lo anterior, los resultados manifestaron un efecto plastificante sobre las películas de alginato a partir del 0.2 %, aunque es más significativo con 1.6 % de miel debido a que se mejora la movilidad en las cadenas del polímero, disminuyendo su esfuerzo máximo y módulo elástico, así como el aumento a la elongación a la ruptura.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de las PCs formuladas*.
Table 4. Mechanical properties of formulated EFs*.

Muestra	Esfuerzo máximo (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Módulo elástico (MPa)
A	96.63±10.82 [a]	5.94±0.6 [a]	3173.3±187.34 [a]
AM.2	51.49±19.76 [b]	3.95±0.29 [b]	2167.63±315.48 [b]
AM.4	85.27±9.65 [c]	3.56±0.31 [ca]	3174±686.45 [ca]
AM.8	73.79±7.19 [d]	2.05±0.59 [d]	5075±819 [d]
AM1.2	35.67±6.27 [e]	2±0.55 [ed]	2036.63±148.9 [e]
AM1.6	18.36±1 [f]	9±2 [f]	283.88±40 [f]

* Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Análisis morfológico

La morfología de la superficie de las películas realizada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se presentan en la Figura 2. Las micrografías a 200X correspondientes a las PCs A y AM.2; se observan en ambas imágenes una superficie porosa, rugosa con ligeras ondulaciones. A comparación de las micrografías de las PCs AM.4, AM.8 y AM1.2; en estas se observa una reducción en la porosidad debido a que contienen una mayor concentración de miel, y presentaron una mejor dispersión de este componente en la matriz de alginato. Lo anterior favorece que la superficie de las películas se observe una mejor homogeneidad a nivel de microdominios, ya que no se observaron evidencias de separación de fases, así como mayor cohesión de los componentes, redundando en las interacciones entre el alginato y la miel. Acevedo *et al.* (2018) evaluó las propiedades de las películas de alginato de sodio adicionadas con aceite esencial de tomillo, observando que estos aceites en función de su concentración lograban desaparecer las rugosidades del recubrimiento conservando una superficie más lisa, resultado similar se observa en la PCs AM1.6, la cual; presentó una superficie más lisa, de textura suave y elástica.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Los espectros de IR permitieron identificar los cambios en los grupos funcionales de las películas formuladas. Los espectros de las PCs formuladas se presentan en la Figura 3. Los grupos funcionales principales del alginato correspondientes a la película A presentaron las bandas características de grupos hidroxilos (-OH) a 3300 cm^{-1}, a 2930 cm^{-1} de enlaces carbono hidrógeno (C-H) y grupos carboxílicos (–COO) a 1600 cm^{-1}. Así como las señales características de vibraciones del estiramiento de C–C–H, O–C–H y C–O–C entre 1300 a 1000 cm^{-1}, asociados a la piranosa como ha reportado Ore *et al.* (2020). Sin embargo, en las películas AM1.2 y AM1.6 se observa un aumento de la intensidad de la señal a 3300 cm^{-1} correspondiente al grupo funcional hidroxilo (-OH) (Sun *et al*., 2021), debido a la alta concentración de -OH en la glucosa y fructosa presente en la miel (Svečnjak *et al*., 2017). Así mismo, se puede visualizar un aumento de las intensidades de la señal de absorción de las bandas predominantes del alginato 1600 y 1410 cm^{-1} atribuido a vibraciones simétrica y asimétrica

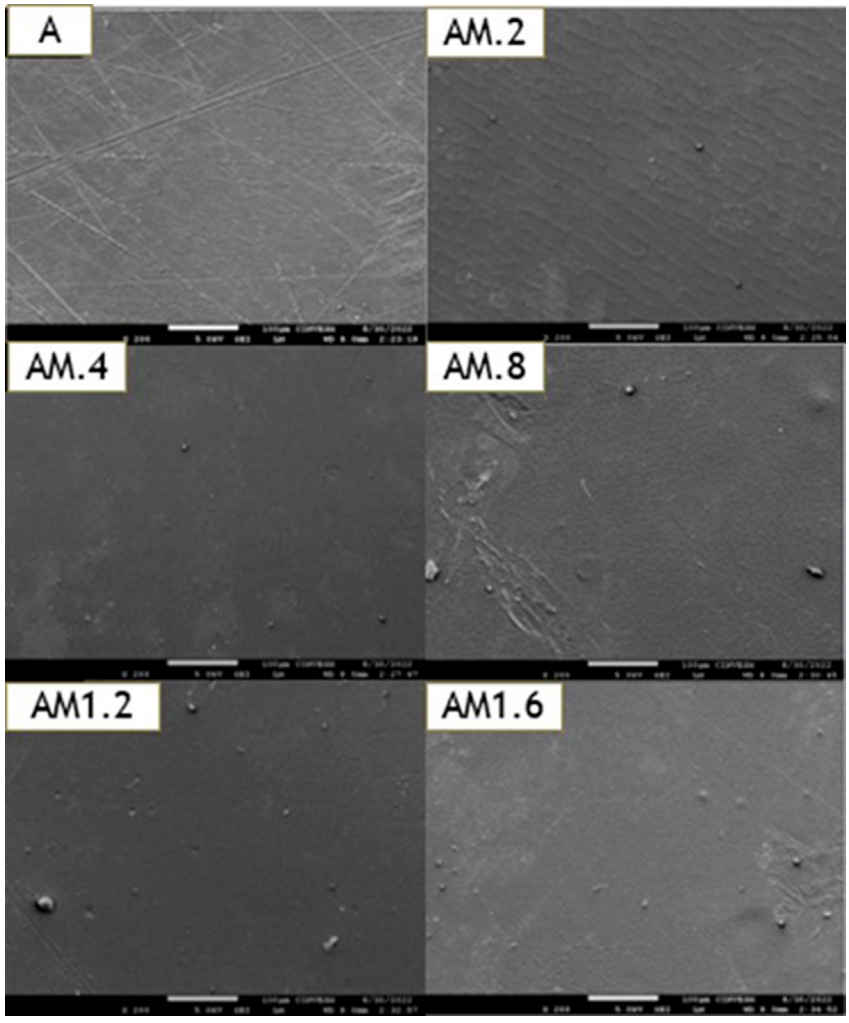


Figura 2. Morfología de la superficie de las PCs formuladas a la magnificación de 200X.
Figure 2. Surface morphology of formulated EFs at 200X magnification.

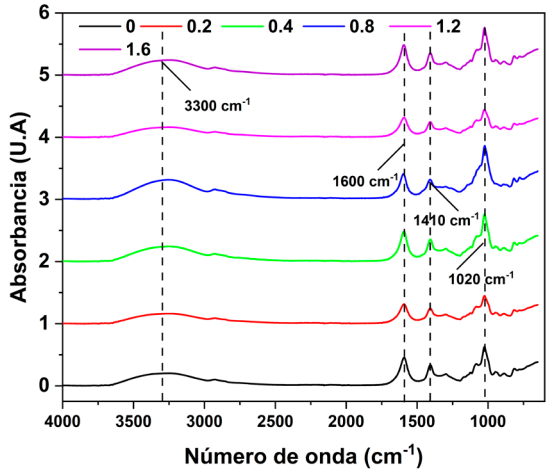


Figura 3. Espectros de infrarrojo de las PCs formuladas: (0) A, (0.2) AM.2, (0.4) AM.4, (0.8) AM.8, (1.2) AM1.2 y (1.6) AM1.6V.
Figure 3. Infrared spectra of formulated EFs: (0) A, (0.2) AM.2, (0.4) AM.4, (0.8) AM.8, (1.2) AM1.2 y (1.6) AM1.6.

del grupo carboxilo (–COO) (Sun *et al*., 2017; 2019). lo que conlleva a que la adición de miel hasta un 1.6 % no afecta la química estructural de las películas basadas en alginato de sodio.

Propiedades bioactivas

El contenido de fenoles totales (FT) de los recubrimientos formulados se presenta en la Tabla 5. La película de alginato (A) presentó el menor valor de contenido de FT, siendo este valor muy similar al reportado por Santos *et al.* (2021) para el alginato. Las películas formuladas mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de FT, siendo las formulaciones AM1.2 y AM1.6 las que presentaron valores significativamente mayores ($p < 0.05$); esto se debe a la retención de compuestos fenólicos relacionados con el aumento de la concentración de miel presentes en las películas (Yousuf y Srivastava, 2019). Así mismo, se ha reportado la presencia de polifenoles en la miel indicando la capacidad de atrapar radicales libres causantes del estrés oxidativo, reduciendo la probabilidad de padecer enfermedades crónicas (Hossen *et al*., 2017). Por lo anterior, varios compuestos presentes en las PCs formuladas podrían desempeñar un papel muy importante para el tratamiento de diversas enfermedades.

Tabla 5. Valores del contenido de fenoles totales (FT) y actividad antioxidante (ABTS) de las PCs formuladas*.
Table 5. Total phenol content (TP) and antioxidant activity (ABTS) values of the formulated EFs*.

Muestra	FT (mg EAG/100 g)	ABTS (% inhibición)
A	55.06 ± 0.94^{a}	7.02 ± 0.21^{a}
AM.2	106.34 ± 2.35^{b}	9.21 ± 0.28^{b}
AM.4	117.16 ± 1.88^{c}	10.07 ± 0.42^{bc}
AM.8	146.33 ± 2.82^{d}	13.75 ± 0.28^{d}
AM1.2	151.98 ± 0.94^{e}	14.96 ± 0.21^{de}
AM1.6	165.62 ± 3.29^{f}	16.31 ± 0.28^{f}

* Valor promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las PCs formuladas presentaron una relación directa entre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de compuestos captadores de radicales libres (Tabla 5). Las PCs con menor concentración de miel A y AM.2 son las que presentaron menor capacidad de inhibición del radical libre ABTS, valores similares fueron reportados por Benslima *et al*. (2021). Se ha reportado que la miel tiene la capacidad de actuar como antioxidante inhibiendo la formación de radicales libres (Rodríguez *et al*., 2007). Es por ello, que las PCs con mayor contenido de miel presentaron mayor inhibición del radical libre ABTS, actuando como secuestradores de radicales libres y donadores de hidrógenos (Gheldof *et al*., 2002), los cuales crean un sistema antioxidante único en la miel mejorando el sistema de defensa en un alimento evitando su deterioro aumentando su tiempo de vida útil.

CONCLUSIONES

El uso de la técnica de solución-vaciado en placa permitió la elaboración de PCs basadas en alginato y diferentes concentraciones de miel melipona. Las PCs fabricadas fueron homogéneas y uniformes en color, con una ligera tonalidad amarilla. La caracterización de las PCs formuladas presentaron diferencias en sus propiedades tanto el espesor, densidad, humedad, ópticas, estructurales, de barrera, morfológicas, contenido de polifenoles y actividad antioxidante, en función del contenido de miel presente. Sin embargo, el estudio de la evaluación de las propiedades mecánicas se observó que la miel presentó características de agente plastificante; lo cual, significó una mejora en la flexibilidad de la PC, para ser empleada como envase en alimentos. Por otro lado, las películas elaboradas que contienen miel melipona han presentado propiedades bioactivas, de aquí que la miel melipona sea considerada como agente funcional plastificante, representan una alternativa en el desarrollo de recubrimientos alimenticios bioactivos que permitan conservar la calidad de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

El análisis de morfología (SEM-EDS) y de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) fueron realizados en el Laboratorio Nacional LANNBIO del Cinvestav Mérida, con el apoyo de los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONAHCyT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822. A los Dres. Patricia Quintana Owen, William Santiago González y Víctor Rejón M. por el apoyo recibido para la caracterización de los materiales.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tienen ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

Abdel, M., Salama, H. y Saad, G. 2018. Diglycidyl ether of bisphenol A/chitosan-graft-polyaniline composites with electromagnetic interference shielding properties: Synthesis, characterization, and curing kinetics. Polymers Engineering & Science. 59: 1-10. doi: 10.1002/pen.24933

Abdel, M. y Salama, H. 2021a. Biocompatible and antimicrobial carboxymethyl xanthan/zinc physical hydrogels. Polymer Bulletin. 79: 3219-3231. doi: 10.1007/s00289-021-03668-z

Abdel, M. y Salama, H. 2021b. Developing multifunctional edible coatings based on alginate for active food packaging. International Journal of Biological Macromolecules. 190: 837-844. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.031

Acevedo, A., Soliva, R. y Martín, O. 2018. Photo-protection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. Journal of Food Engineering. 229: 72-82. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.024

Benslima, A., Sellimi, S., Hamdi, M., Nasri, R., Jridi, M., Cot, D., Zouari, N., Li, S. y Nasri, M. 2021. The brown seaweed *Cystoseira schiffneri* as a source of sodium alginate: Chemical and structural characterization, and antioxidant activities. Food Bioscience. 40: 1-10. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100873

Bodor, Z., Benedek, C., Urbin, Á., Szabó, D. y Sipos, L. 2021. Colour of honey: ¿can we trust the Pfund scale? An alternative graphical tool covering the whole visible spectra. Food science and technology. F149:1-9. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111859

Castillo, A., Moguel, Y., Cortés, M., Espinosa, E., Arechavaleta, M. y Mora, M. 2016. Composición botánica de mieles de la península de Yucatán, mediante qPCR y análisis de curvas de disociación. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 7: 489-505

Cazón, P., Velázquez, G. y Vázquez, M. 2020. Regenerated cellulose films combined with glycerol and polyvinyl alcohol: Effect of moisture content on the physical properties. Food Hydrocolloids, 103: 1-39. 105657. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105657

Chan, D., Toledo, V., Vargas, M., Rincón, S., Rodríguez, A. y Madera, T. 2021. Preparation and characterization of chitosan-based bioactive films incorporating *Moringa oleifera* leaves extract. Journal of Food Measurement and Characterization 15: 4813-4824. doi: 10.1007/s11694-021-01055-w

Chen, G., Ali, F., Dong, S., Yin, Z., Li, S. y Chen, Y. 2018. Preparation, characterization and functional evaluation of chitosan-based films with zein coatings produced by cold plasma. Carbohydrate Polymers. 202: 39-46. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.122

Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N. y Cedrón, J. 2013. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus L.*). Revista de la Sociedad Química del Perú. 79: 57-63.

Dhanapal, A., Rajamani, L. y Banu, M.S. 2012. Edible films from Polysaccharides. Food Science and Quality Management. 3: 9-17.

Fairchild, M. 2005. Color appearance models. In: Munsell laboratory Rochester Institute of Technology, USA, Editorial John Wiley & Sons, Ltd. 166-180.

García, A., Ayala, A. y Sánchez, M. 2019. Efecto de recubrimientos comestibles de Aloe vera y alginato de sodio sobre la calidad poscosecha de fresa. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica. 22: 1-8.

Gheldof, N., Wang, X. y Engeseth, N. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 5870-5877. doi: 10.1021/jf0256135

Hossen, M.S., Ali, M.Y., Jahurul, M.H.A., Abdel-Daim, M.M., Gan, S.H. y Khalil, M.I. 2017. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: a review. Pharmacological Reports. 69: 1194-1205. doi: 10.1016/j.pharep.2017.07.002

Joshi, D., Goyal, A. y Rath, G. 2014. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. Drug Delivery. 23: 363-377. doi: 10.3109/10717544.2014.935531

Ncube, L., Ude, A., Ogunmuyiwa, E., Zulkifli, R. y Beas, I. 2021. An overview of plastic waste generation and management in food packaging industries. Recycling. 6: 1-25. doi: 10.3390/recycling6010012

Nouraddini, M., Esmaiili, M. y Mohtarami, F. 2018. Development and characterization of edible films based on eggplant and corn starch. International Journal of Biological Macromolecules, 120: 1639-1645. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.126

Ore, Y., Renzo, E. y Valderrama, A. 2020. Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 86(3):276-287.

Pereira, R., Tojeira, A., Vaz, D., Mendes, A., y Bartolo, P. 2011. Preparation and characterization of films based on alginate and aloe vera. International Journal of Polymer Analysis and Characterization. 16: 449-464. doi: 10.1080/1023666X.2011.599923

Ramos, M., Romero, C. y Bautista, S. 2018. Almidón modificado: propiedades y usos como recubrimientos comestibles para la conservación de frutas y hortalizas frescas. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 19 (1): 30-44.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice E. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolonization assay free Radical. *Biology and Medicine*, 26; 1231-1337, 1.

Rocha, J., Azamar, B., Ortiz, E., Quintana, P. Freile, Y., Gamboa, F. y Madera, T. 2021. Development and physical characterization of novel bio-nanocomposite films based on reduced graphene oxide, agar and melipona honey. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2:1-9. doi: 10.1016/j.carpta.2021.100133

Rodríguez, J., Madera, T., Sánchez, D., López, J. y Soto, H. 2014. Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. Journal of Polymers and the Environment. 22: 41-51. doi: 10.1007/s10924-013-0621-z

Rodríguez, M., Antonio, J., Pérez, P., Elizabeth, M. y Vit, P. 2007. Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 38(2):13-18.

Rojas, G. y Tim, O. 2016. Determinación de la degradación térmica de polímeros por análisis de cambio de color. Ingeniería. Universidad Distrital Francisco José de Caldas Bogotá, Colombia. 21: 19-30.

Salama, H. y Aziz, M. 2020. Novel biocompatible and antimicrobial supramolecular O-carboxymethyl chitosan biguanidine/zinc physical hydrogels. International Journal of Biological Macromolecules. 163: 649-656. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.029

Santos, L., Silva, G., Gomes, B. y Martins, V. 2021. A novel sodium alginate active films functionalized with purple onion peel extract (*Allium cepa*). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102096*. doi:10.1016/j.bcab.2021.102096

Solano, L., Alamilla, L. y Jiménez, C. 2018. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21: 30-42. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153

Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X. y Guo, Y. 2017. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. Carbohydrate Polymers. 163: 81-91. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.016

Sun, X., Jia, P., Zhe, T., Bu, T., Liu, Y., Wang, Q. y Wang, L. 2019. Construction and multifunctionalization of chitosan-based three-phase nano-delivery system. Food Hydrocolloids. 96: 402-411. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.05.040

Sun, X., Zhang, H., Wang, J., Dong, M., Jia, P., Bu, T. y Wang, L. 2021. Sodium alginate-based nanocomposite films with

strong antioxidant and antibacterial properties enhanced by polyphenol-rich kiwi peel extracts bio-reduced silver nanoparticles. Food Packaging and Shelf Life. 29: 1-12. 100741. doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100741

Svečnjak, L., Prđun, S., Rogina, J., Bubalo, D. y Jerković, I. 2017. Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar - to - honey transformation pathway using FTIR-ATR spectroscopy. Food Chemistry. 232: 286-294. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.159

Tapia, M., Rojas, M., Rodríguez, F., Ramírez, J., Carmona, A. y Martin, O. 2007. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. Journal Food Science. 72: 190-196.

Theagarajan, R., Dutta S., Moses J.A. y Anandharamakrishnan C. 2019. Alginates for food packaging applications. En: Alginates: Applications in the biomedical and food industries. 205-232

Zarei, M., Fazlara, A. y Tulabifard, N. 2019. Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. Heliyon, 5: 1-6. doi: 10.1016/j.heliyon. 2019.e01894.

Yousuf, B. y Srivastava, A 2019. Impact of honey treatments and soy protein isolate-based coating on fresh-cut pineapple during storage at 4 °C. Food Packaging and Shelf Life. 21: 1-9. doi:10.1016/j.fpsl.2019.100361

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Effect of oxalic acid on postharvest life of tomato modified with the TomLoxB gene in antisense

Efecto del ácido oxálico en la vida poscosecha del tomate modificado con el gen TomLoxB en antisentido

Wendy M. Mazón-Abarca[1], Elizabeth León-García[2*], José A. Ramírez[3] and Hugo S. García[1]

[1] Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Veracruz, México.
[2] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental La Posta, Medellín de Bravo, Veracruz, México.
[3] Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica de Trabajo Social y Ciencias para el Desarrollo Humano, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

ABSTRACT

Oxalic acid is an organic compound found in green leafy vegetables, which has proven to be effective in delaying ripening by inhibiting ethylene synthesis in fruits such as banana, mango, peach, tomato, plum, and others. In this study, the response to oxalic acid application on postharvest physiology was evaluated in transgenic tomatoes (*Solanum lycopersicum*) variety TA234 with the *TomLoxB* gene insertion in antisense, at two concentrations of oxalic acid: 3 and 10 mM, during 30 d of storage at 25 ± 1 ºC and a relative humidity of 65 - 70 %. The fruits were harvested at break stage and immersed for 10 minutes in the oxalic acid solution, which was maintained at 25 ºC. Upon treatment, less weight loss, better retention of lightness, delay in the decrease of firmness and hue angle, decrease in lipoxygenase activity, low electrolyte leakage and increase in total phenolics content were observed. The most effective oxalic acid concentration was 3 mM, that extended postharvest life by up to 30 d and reduced deterioration of the genetically modified (GM) tomatoes. In turn, the untreated GM tomatoes showed an acceptable appearance up to day 24 of storage, while the wild type fruits were kept satisfactorily for 15 d.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; lipoxygenase B; electrolyte leakage; total phenolic content.

RESUMEN

El ácido oxálico es un compuesto orgánico que se encuentra en vegetales de hoja verde y que ha demostrado ser eficaz para retrasar la maduración mediante la inhibición de la síntesis de etileno en frutos. En este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de ácido oxálico sobre la fisiología poscosecha en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad TA234 genéticamente modificados (GM) con la inserción del gen *TomLoxB* en antisentido, a dos concentraciones de ácido oxálico (3 y 10 mM) durante 30 d de almacenamiento a 25 ± 1 ºC y una humedad relativa del 65 - 70 %. Los frutos en estado *break* se sumergieron durante 10 min en la solución de ácido oxálico. Se observó una menor pérdida de peso, mejor retención de la luminosidad, un retraso en la disminución de la firmeza y del ángulo hue, disminución de la actividad lipoxigenasa, baja pérdida de electrolitos y un aumento en el contenido de fenoles totales. La concentración más eficaz fue de 3 mM, que prolongó la vida poscosecha hasta 30 d y redujo el deterioro del tomate modificado, mientras los frutos GM testigos tuvieron una vida postcosecha de 24 d y los frutos silvestres testigo se mantuvieron satisfactoriamente por 15 d.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*; lipoxigenasa B; fuga de electrolitos; fenoles totales.

INTRODUCTION

Due to the commercial and nutritional importance of tomato (*Solanum lycopersicum*) around the world, extensive research has been carried out to extend its shelf life and counteract postharvest losses for several years, finding solutions only to certain problems. With the advances in genetic engineering techniques, effective procedures have been developed to improve their properties during postharvest life and extend their shelf life by slowing their ripening rate (Isack and Lyimo, 2015; Asrey *et al*., 2021).

Among the chemical treatments applied to fruits intended to extend postharvest life is oxalic acid, which is an organic acid widely distributed in plants. Oxalic acid plays an important role in stress response and redox homeostasis in plant as well as exerts antisenescence effects. The presence of oxalic acid increases the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase among others, and promotes the accumulation of antioxidants such as flavonoids, total phenolic compounds and carotenoids. Its functions include acting as an acid catalyst, metal ion chelator, as well as an electron donor (Shimada *et al*., 1997). It has been shown to delay the ripening process in fruits such as mango (Zheng *et al*., 2007a; Razzaq *et al*., 2015), banana (Huang *et al*., 2013), tomato (Kant *et al*., 2013; Li *et al*., 2016), pear (Tarabih, 2014), peach (Zheng *et al*., 2007b; Razavi *et al*., 2017), sweet cherry (Valero *et al*., 2011) and plum (Wu *et al*., 2011). These authors used oxalic acid solutions at milimolar concentrations, reporting favorable effects on the preservation of fruit attributes.

An unexplored field is the application of oxalic acid on

*Correspondence author: Elizabeth Leon Garcia
e-mail: eliibq@gmail.com
Received: July 8, 2023
Accepted: November 27, 2023
Published: January 12, 2024

GM fruits, and its putative effect on their postharvest physiology. There have been work about fruit softening such as: pectinmethyl esterase (PME) and polygalacturonase (PG) silencing (Pear *et al*., 1993), β-Galactosidase silencing (Smith *et al*., 2002), *TomLoxA* and *B* gene silencing (Griffiths *et al*., 1999; Bo *et al*., 2008; Hu *et al*., 2014).

León-García *et al*. (2017) silenced the *TomLoxB* gene in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits variety TA234, that resulted in increased firmness, reduced lipoxygenase activity and extended shelf life compared to control fruits. Studies have been conducted to learn about the physiology of the modified tomatoes (Velázquez-López *et al*., 2020; Mazón-Abarca *et al*., 2022a; Mazón-Abarca *et al*., 2022b); however, more work remains to be pursued. The objective of this study was to evaluate the response of tomato (*Solanum lycopersicum*) variety TA234 with silenced *TomLoxB* gene after the application of oxalic acid during ripening. Overall physiology, lipoxygenase activity, electrolyte leakage and total phenolics content were monitored.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

In a prior investigation, León-García *et al*. (2017) conducted a study focused on the production of transgenic tomato plants with antisense constructs targeting tomato lipoxygenase (*TomloxB*) to carry out the genetic modification. The researchers employed *Rhizobium radiobacter* strain LBA4404 (previously known as *Agrobacterium tumefaciens*), containing the binary vector pCAMBIA 2301, which carried the CaMV 35S promoter. To effectively monitor and assess the success of the transformation, two specific genes were employed: neomycin phosphotransferase (NPTII) as a selection marker, and β-glucuronidase (UIDA) as a reporter gene. The plasmid used in the study contained the *TomloxB* sequence, which was 2745 base pairs long. This specific sequence, with its corresponding GenBank accession number U09025, was inserted into the plasmid in the antisense direction. Genetically modified (GM) tomatoes from the F1 lineage and unmodified or wild-type (WT) fruits from the same TA234 variety were included as a basis of comparison. Located at the Instituto Tecnológico de Veracruz , we find the postharvest handling laboratory, in whose greenhouse both, wild type and transgenic tomato fruits, were planted, grown and harvested. Four hundred and ninety-five tomatoes weighing between 18 and 20 g, at break maturity stage with no apparent skin damage were chosen. Subsequently, they were washed by immersion in a 500 mg/L sodium hypochlorite solution for 2 m and placed on a grid to remove surface water.

Chemical preparation and treatments

For the preparation of the oxalic acid (OA) solutions (Sigma-Aldrich®, Merck, St. Louis, MO) applied to tomatoes selecting different concentrations according to previous studies (Kant *et al*., 2013; Li *et al*., 2016); two concentrations were selected: 3 and 10 mM to carry out the study. Tomatoes were immersed in the respective solutions for 10 min at 25 °C. After treatment, they were placed in a plastic container for 3 h to remove the solution from the surface and subsequently stored at 25 °C with a relative humidity of 65-70 %.

Postharvest monitoring

Weight loss

Tomato weight was measured using an electronic balance (Sartorius, model BL 2100, Germany). Percent weight loss over time was reported.

External color

With the use of a Hunter lab colorimeter (model 4500L, Reston, VA), Lighness and Hue angle were measured at three different spots on the equatorial zone of the fruit (Kalantari *et al*., 2015).

Firmness

The force needed to puncture the tomato fruit was calculated in three equatorial spots with a fruit texture analyzer (model GS25, Geneq Inc., Montreal, Canada) fitted with an 8 mm diameter stainless steel cylindrical probe.

Lipoxygenase activity

Lipoxygenase (LOX) activity was assayed according to Velázquez-López *et al*. (2020), using linoleic acid as substrate. Tomato juice was extracted and centrifuged for 5 min at 8765xg in an Eppendorf centrifuge model 5415R (Hamburg, Germany). The supernatant was filtered with a 0.45 µm pore diameter Millipore membrane disc filters. Forty µL of the sample were taken, mixed with 1360 µL of 0.2 M sodium phosphate buffer and 2.64 mL of substrate consisting of 42 µL of linoleic acid (Sigma-Aldrich®), 39 µL of Tween 20 (Sigma-Aldrich®) and 250 µL of 1 N NAOH (Golden Bell®); subsequently the volume was made up to 100 mL with sodium phosphate buffer and kept at 37 ºC for 10 m. To stop the reaction, the samples were cooled in ice water. A UV-Vis spectrophotometer with diode array (Agilent Technologies®, model 8453, Waldbronn, Germany) was used to measure the absorbance at 234 nm.

Electrolyte leakage

Electrolyte leakage was estimated according to the method of Li *et al*. (2016) with some changes. Two 6-mm diameter discs per tomato were removed with a scalpel from the equatorial and opposite region of the fruit. Five tomatoes were used for each treatment. Fruits were then immersed in 40 mL of distilled water and incubated for 3.5 h at 25 ºC. Electrical conductivity was measured using a benchtop conductivity meter (Thermo Scientific Orion 1114000-WA, 3star, Madrid, Spain), then the samples were placed on a stirring hot plate (Corning PC-420D, Somerville, MA) for 20 m at 230 ºC and incubated for 3.5 h at 25 ºC. Electrical conductivity was measured after the incubation time was completed. The percentage of total electrolyte leakage was defined as the ratio between the initial and final conductivity, multiplied by 100.

Total phenolics content

Total phenolics content was analyzed according to the method reported by Domínguez *et al*. (2016): 200 µL filtered tomato juice was blended with 1 mL of Folin-Ciocalteau reagent (Sigma-Aldrich®), shaken vigorously and after 3 min, 1.5 mL of 7 % sodium carbonate (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico) and 800 µL of Milli-Q water were added, then incubated for 1 h at 25 °C. The absorbance was measured at 765 nm using a UV-Vis diode array spectrophotometer (Agilent Technologies, model 8453, Waldbronn, Germany). Total phenolics were reported as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g FW (Fresh Weight). Based on a calibration curve with different concentrations of gallic acid and performed in duplicate, with a R^2 of 0.9997.

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized design (CRD) was used. Analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's rank test ($p < 0.05$) were employed to investigate the difference between treatments. The analyses were computed in Minitab v. 18 (LLC, State College, PA). All treatments were made in triplicate.

RESULTS

Weight loss

The data obtained for weight loss were as follows: GM-3mM tomatoes showed a significantly ($p < 0.05$) smaller weight loss of 8.51 ± 0.30 % compared to the rest of the treated tomatoes during the entire 30-days storage period (Figure 1). WT-C tomatoes showed the highest weight loss (19.57 ± 0.39 %) during the same period. The 3 mM concentration allowed lower weight losses than the 10 mM treatment. Likewise, GM fruits were superior in response to wild-type fruits.

Lightness

Lightness in GM-3 mM tomatoes, recorded a significantly lower decrease of 45.07 ± 0.30 L* ($p < 0.05$), compared to GM-C treatments with 42.92 ± 0.83 L* and GM-10 mM with 38.96 ± 0.59 L*. WT-3 mM tomatoes recorded values of 40.47 ± 0.68 L*, being significantly higher ($p < 0.05$) than WT-C tomatoes with 36.51 ± 0.53 L* and WT-10 mM tomatoes with 37.61 ± 0.31 L* at 15 days of storage; with GM-3 mM tomatoes having the highest values, among all treatments (Figure 2).

Hue angle

The Hue angle value for the tomatoes analyzed at the break stage was 88.76 ± 1.90 °; when they reached the red color, an indication of fruit ripening; their values were 41.32 ± 1.68 *h°*. All the treated tomatoes gradually decreased the Hue angle values throughout the storage period. GM-3 mM tomatoes showed a significantly ($p < 0.05$) lower decrease in Hue angle with a value of 43 ± 1.38 °, compared to GM-C tomatoes with 39 ± 1.53 ° and GM-10 mM tomatoes with 37 ± 1.39 °, even to WT-3 mM tomatoes with 37 ± 1.38 °, and to both WT-10 mM and WT-C tomatoes with a value of 35 ± 1.99 ° on day 24 of storage (Figure 3).

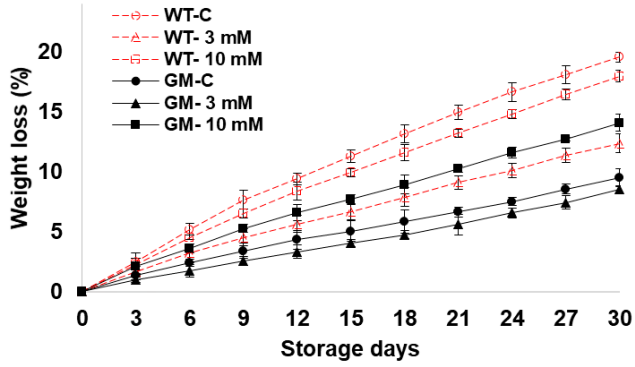


Figura 1. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre la pérdida de peso en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.

Figure 1. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on weight loss in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

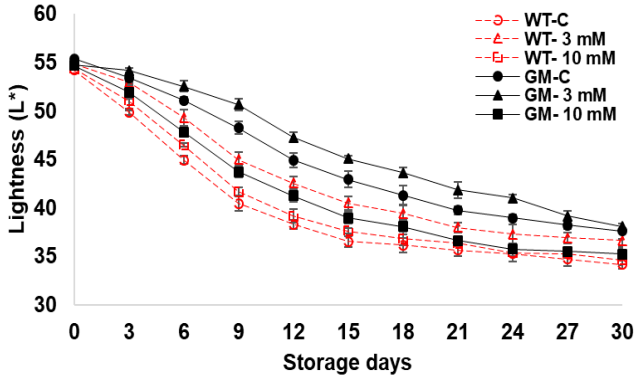


Figura 2. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre la luminosidad en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.

Figure 2. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on lightness in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

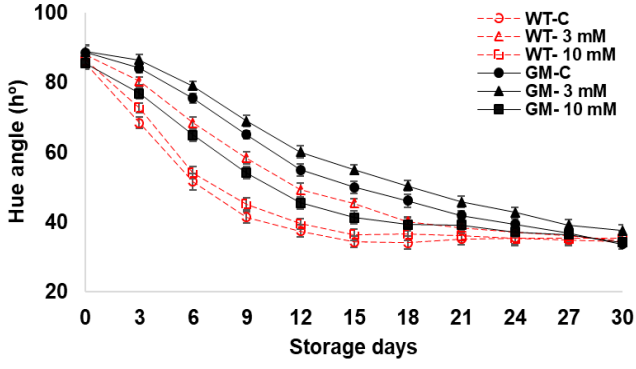


Figura 3. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre el ángulo Hue en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.

Figure 3. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on Hue angle in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

Firmness

A decrease in firmness was observed during storage for both types of tomatoes (Figure 4). No significant differences ($p < 0.05$) in firmness were found between GM-C (6.3 ± 0.25 N) and GM-3 mM (6.7 ± 0.24 N) tomatoes in the first 6 days. From day 30, the firmness of GM-3 mM (3.9 ± 0.23 N) tomatoes maintained higher values than the rest of the treatments, especially WT-C (2.9 ± 0.17 N) tomatoes at day 30 (Figure 4).

LOX activity

WT-C tomatoes showed a maximum peak of LOX activity with 1433 ± 57.1 U/mg protein on day 12, whereas WT-3 mM tomatoes recorded the maximum activity of 1254 ± 38.72 U/mg protein on day 18. Conversely, both GM-C tomatoes with an activity of 1122 ± 32.83 U/mg protein and GM-3 mM tomatoes with 935 ± 36.37 U/mg protein showed the highest peak until day 24; the latter having significantly lower LOX activity ($p < 0.05$) among all treatments (Figure 5).

Electrolyte leakage

Electrolyte leakage gradually increased during ripening in storage. Transgenic fruits manifested a better response measured in lower electrolyte leakage than wild-type fruits. GM-3 mM tomatoes showed a significantly lower electrolyte leakage rate of 62.48 ± 3.30 % ($p < 0.05$) with respect to WT-C tomatoes with 92 ± 3.39 % at day 30 of storage. In turn, GM-C tomatoes recorded an electrolyte leakage of 69 ± 3.80 % and for WT-3 mM tomatoes it was 77 ± 3.77 %, finding no significant differences (Figure 6).

Total phenolics content

Regarding the total phenolics content in both, transgenic and wild-type fruits, this value increased during the entire storage time. By means of a two-way ANOVA, it was determined that time had a significant effect on phenolics content, as well as the different factors (*fruits*:WT or GM and *oxalic acid concentration*: 0, 3 and 10 mM) over time ($p < 0.05$).

Specifically in GM-3 mM tomatoes, it was significantly higher ($p < 0.05$) with a value of 11.76 ± 0.13 mg GAE/100 g FW, compared to WT-C tomatoes with 9.85 ± 0.14 mg GAE/100 g FW, to WT-3 mM tomatoes with 10.5 ± 0.18 mg GAE/100 g FW, to GM-C tomatoes with 11.0 ± 0.18 mg GAE/100 g FW at day 30 of storage. (Figure 7).

DISCUSSION

The data show a positive effect during the ripening of GM fruits and the application of OA. By analyzing the mechanism of action of each of the factors (oxalic acid and silencing of *TomloxB* gene) we could argue that there was an additive effect, but also a synergistic effect. It is an additive effect, since both promote a different mechanism by which senescence in the fruit is delayed. Silencing of the *TomloxB* gene delays the metabolic and biochemical processes that lead to senescence. Furthermore, OA promotes the accumulation of antioxidant molecules and enzymes (ascorbate peroxidase, catalase, glutation reductase and others) which help to neu-

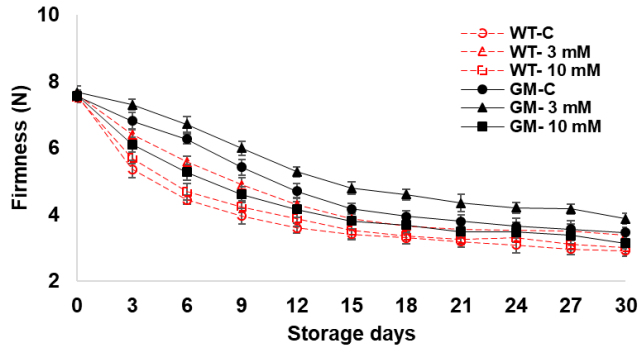


Figura 4. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre la firmeza en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.
Figure 4. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on firmness in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

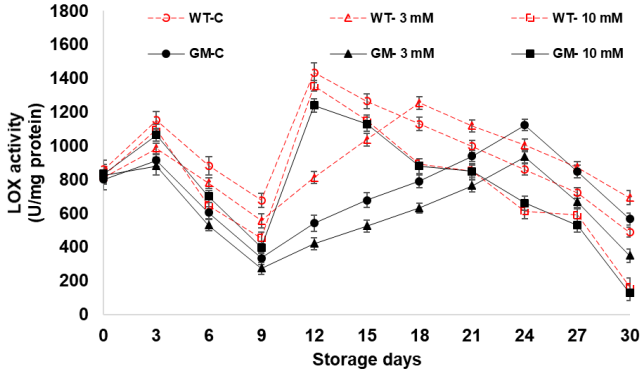


Figura 5. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre la actividad de LOX en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.
Figure 5. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on LOX activity in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

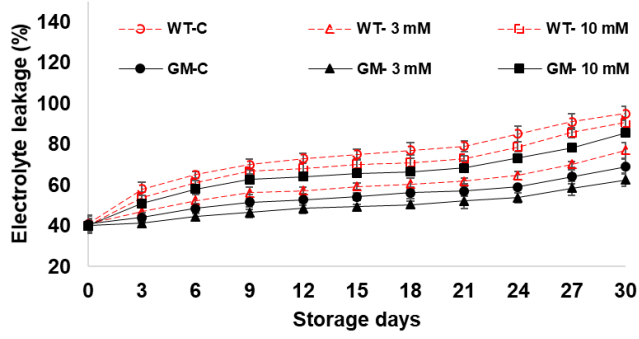


Figura 6. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre la fuga de electrolitos en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.
Figure 6. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on electrolyte leakage in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

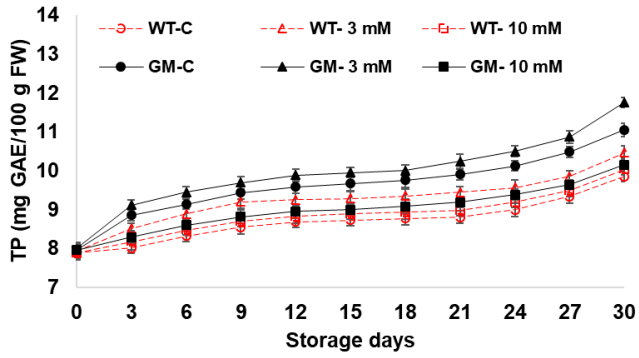


Figura 7. Efecto del tratamiento con ácido oxálico a 3 y 10 mM sobre el contenido de fenoles totales (TP) en tomates silvestres (WT) y modificados genéticamente (GM) mantenidos a 25 ± 1 °C durante 30 d. Los tomates testigo de ambas líneas se designan con la letra C.
Figure 7. Effect of oxalic acid treatment at 3 and 10 mM, on total phenol content (TP) in wild type (WT) and genetically modified (GM) tomatoes stored at 25 ± 1 °C for 30 d. The control tomatoes of both lines are designated with the letter C.

tralize free radicals generated during the decompartmentalization of the cell membrane, maintaining textural quality and lowering softening during storage, and therefore contributes to the delay in the processes of oxidative deterioration in this membrane, preserving its integrity for a longer time and thus contribute to the delay of senescence (Hasan *et al*., 2023; Ali *et al*., 2021; Wu *et al*., 2011; Wang *et al*., 2009).

On the other hand, it could also be assumed that there was a synergistic effect in the fruits modified with the silencing of the *TomloxB* gene and the application of OA. There is a positive regulation between the TomloxB enzyme and ethylene, by decreasing the activity of the enzyme, attributed to the effect of silencing; ethylene production decreased due to a reduction in the activity of the enzyme ACC Oxidase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase) at the *Break* stage of ripening (Velazquez-López *et al*., 2019), an enzyme required for the last step of ethylene production from methionine. In addition to this, OA also affects ethylene production by decreasing the activity of a key enzyme in the production pathway of this hormone from methionine, ACC synthase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase), and since ethylene is the key hormone in ripening, this process is also affected (Wu *et al*., 2011; Wang *et al*., 2009).

The treatments (WT and GM) with application of OA at a concentration of 3 mM showed the best results compared to their respective controls. Weight loss was lower, due to a mesocarp wall strengthening and a softening slowdown, caused by the formation of oxalate-pectin complex as a result of the application of OA (Martínez-Esplá *et al*., 2019). In this experiment, a smaller weight loss of 8.5 % was obtained in GM fruits, with 3 mM at day 30. Here the synergistic effect is shown, between the afore mentioned mechanisms of action of OA and the silencing of *TomLoxB* gene, which decreased the production and expression of the same enzyme, preventing the fatty acids that constitute the membrane from being oxidized by the enzyme (Velázquez-López *et al*., 2020; León-García *et al*., 2017). This also contributed to maintaining lightness (L*) longer in GM-C (18 %) and GM-3mM (23 %) tomatoes at day 15 and GM-C (10 %) and GM-3mM (12 %) at day 30, compared to WT-C control fruits (36 L*, day 15; 34 L*, day 30). The same trend was observed for color, measured as Hue angle, where a gradual decrease was recorded for GM-C, GM-3 mM and WT-3 mM tomatoes. Therefore, we can infer that the slow decrease in Hue angle may be attributed to a reduction in ethylene production, which promotes carotenoid biosynthesis (Sun *et al*., 2020). In this case, the decrease in ethylene production is a result of the synergy between OA and *TomLoxB* gene silencing.

GM fruits had higher firmness than WT fruits, and the GM-3 mM treatment had the highest firmness retention. The application of OA decreased the fruit softening process by the formation of an oxalate-pectin complex that strengthens the mesocarp wall, conferring greater firmness to the fruit (Martínez-Esplá *et al*., 2019). Kant *et al*. (2013) showed that tomatoes treated with 3 mM OA recorded an improvement in tomato firmness for up to 21 d compared to the control that lasted 15 d, attributing this fact to a low solubilization of pectin, which in turn improved water holding capacity and decreased cell wall-degrading enzymes activity. While the effect of OA on WT tomato has shown to have an impact on cell wall degrading enzymes, for GM tomato the antisense insertion of the *TomLoxB* gene confers an additional effect, which bestows integrity to the membrane by decreasing the expression of lipoxygenase. This maintains intact the fatty acids of the membrane longer, thus preserving its integrity (León-García *et al*., 2017).

The 3 mM OA concentration (WT-3 mM and GM 3 mM) had a delaying effect on LOX activity and therefore the fruits showed a delay in senescence. Ding *et al*. (2007) also showed low LOX activity in mangoes treated with OA for up to 30 days of storage, attributing this effect to the ability of OA to inhibit peroxide accumulation. Therefore, the decrease in LOX activity in tomato is attributed to the action of OA, which induced resistance to the peroxidation of fatty acids present in the membrane and, together with the low expression of lipoxygenase in the tomato modified by the insertion of the *TomLoxB* gene in antisense, decreased the accumulation of hydroperoxides responsible for causing damage to the membrane and thus preserve its integrity, thereby extending its shelf life.

It is reported that OA can increase the activity of antioxidant enzymes such as catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, among others. Application of 3 mM OA in tomato was effective in reducing electrolyte leakage in WT (61 %) and GM (52 %) fruits on day 21, compared to their WT-C (79 %) and GM-C (59 %) controls. At the same concentration, Kant *et al*. (2013) reported values of 45.66 % at 21 d of storage, while for the control fruit was 71.66 %. Similar results were obtained by Li *et al*. (2016), who observed that electrolyte leakage in tomatoes treated with OA was significantly smaller by 20 % compared to the control fruits, after been stored between 20 and 32 d. It is reported that OA can increase the activity of antioxidant enzymes, which act

on free radicals released during the ripening and softening process of the fruit, relaxing membrane permeability. Electrolyte loss reflects membrane permeability and, indirectly, the effect of oxalic acid application (Nyanjage *et al*., 1999; Zheng *et al*., 2007c; Razzavi *et al*., 2017) which together with the silencing the *TomLoxB* gene, decreases the expression of lipoxygenase and thus the decompartmentalization and loss of tissue structure in tomato, providing a synergistic effect to extend the postharvest life of the fruit.

OA promotes the accumulation of total phenolic compounds, which favors the protective action against reactive oxygen species (ROS) involved in membrane destabilization. Its positive effect has been proven in peaches (Razavi *et al*., 2017) and mangoes (Razzaq *et al*., 2015), where a significant trend of increased total phenolics content was observed from day 7 to day 21 of storage compared to untreated fruit. It has also been reported that with reduced ethylene levels, there is an increase in phenolic content in tomatoes (Dominguez *et al*.**,** 2016). In this experiment, the 3 mM concentration of OA in GM fruit was the treatment that showed the highest results of total phenolics over time ($p < 0.05$).

The effects of antisenescence and antistress might be associated with ethylene signaling regulated by OA. It has been demonstrated that OA delayed the ethylene climacteric peak and exhibited 2-fold lower rates of ethylene production (Wu *et al*., 2011). Wang *et al*. (2009) reported that reduced ethylene production in OA-treated fruit might be ascribed to the reduced ACC synthase activity. By virtue of the regulation of OA on ethylene, via ACC synthase, and knowing that ethylene is an indispensable and key hormone during the ripening process, it can be assumed that the 10 mM concentration of OA strongly blocked ACCS enzyme production and thus ethylene synthesis, and because of the above, the ripening processes were affected.

In turn, the 3 mM concentration was adequate to partially inhibit the activity of the ACC synthase enzyme, still allowing the production of the hormone, which is necessary to trigger those metabolic and biochemical processes involved in ripening.

CONCLUSIONS

Of the two concentrations of OA applied to WT and GM tomatoes, the 3 mM OA solution, was the one that showed more favorable effects on the physiology of GM tomatoes, producing greater lightness retention, delay in the appearance of red color, greater firmness and total phenolics content, lower weight loss, lipoxygenase activity and electrolyte leakage. All of these resulted in an extension of shelf life of 30 d. In turn, the untreated GM tomatoes showed an appropriate appearance up to day 24 of storage. However, increasing the concentration to 10 mM showed adverse effects on the physiology of both GM and WT tomatoes, that resulted in irregularities in the development of treated fruit such as premature shriveling and uneven coloration, with a shelf life of only 18 d, while the WT control tomatoes had a postharvest shelf life of 15 d.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to CONAHCyT Mexico for the scholarship provided to the first author (271647).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report there are no competing interests to declare.

REFERENCES

Ali, S., Khan, A.S., Malik, A.U., Anwar, R., Anjum, M.A., Nawaz, A., and Naz, S. 2021. Combined application of ascorbic and oxalic acids delays postharvest browning of litchi fruits under controlled atmosphere conditions. Food Chemistry. 350: 129277.

Asrey, R., Barman, K., Prajapati, U., Sharma, S., and Yadav A. 2021. Genetically modified fruit and vegetable-An overview on senescence regulation, postharvest nutraceutical quality preservation and shelf life extension. The Journal of Horticultural Science and Biotechnolgy. 96:271-287.

Bo, Z., Xian, L., and Kun-Song, C. 2008. Molecular cloning of lipoxygenase gene family members in kiwifruit based on EST database. Acta Horticulturae Sinica. 35:337-342.

Ding, Z.S., Tian, S.P., Zheng, X.L., Zhou, Z.W., and Xu, Y. 2007. Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. Physiologia Plantarum. 130:112-121.

Domínguez, I., Lafuente, M.T., Hernández-Muñoz, P., and Gavara, R. 2016. Influence of modified atmosphere and ethylene levels on quality attributes of fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum Mill*.). Food Chemistry. 209:211-219.

Griffiths, A., Prestage, S., Linforth, R., Zhang, J., Taylor, A., and Grierson, D. 1999. Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. Postharvest Biology and Technology. 17: 163-173.

Hasan, M.U., Singh, Z., Shah, H.M.S., Kaur, J., Woodward, A., Afrifa-Yamoah, E., and Malik, A.U. 2023. Oxalic acid: A blooming organic acid for postharvest quality preservation of fresh fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology. 206: 112574.

Hu, T., Zeng, H., Hu, Z., Qv, X., and Chen, G. 2014. Simultaneous silencing of five lipoxygenase genes increases the contents of α-linolenic and linoleic acids in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62:11988-11993.

Huang, H., Jing, G., Guo, L., Zhang, D., Yang, B., Duan, X., Ashraf, M., and Jiang, Y. 2013. Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage. Postharvest Biology and Technology. 84: 22-27.

Isack, M.E., and Lyimo, M. 2015. Effect of postharvest handling practices on physicochemical composition of tomato. International Journal of Vegetable Science. 21: 118-127.

Kalantari, S., Hatami, M., and Delshad, M. 2015. Diverse postharvest responses of tomato fruits at different maturity stages to hot water treatment. International Journal of Horticultural Science and Technology. 2: 67-74.

Kant, K., Arora, A., Singh, V.P., and Kumar, R. 2013. Effect of exogenous application of salicylic acid and oxalic acid on postharvest shelf-life of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). Indian Journal of Plant Physiology. 18:15-21.

León-García, E., Vela-Gutiérrez, G., Del Ángel-Coronel, O.A., Torres-Palacios, C., De La Cruz-Medina, J., Gómez-Lim, M.A., and García, H.S. 2017. Increased postharvest life of TomLox B silenced mutants of tomato (*Solanum lycopersicum*) Var. TA234. Plant Foods for Human Nutrition. 72: 380-387.

Li, P., Yin, F., Song, L., and Zheng, X. 2016. Alleviation of chilling injury in tomato fruit by exogenous application of oxalic acid. Food Chemistry. 202:125-132.

Martínez-Esplá, A., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Valero, D., and Zapata, P.J. 2019. Oxalic acid preharvest treatment increases antioxidant systems and improves plum quality at harvest and during postharvest storage. Journal of the Science of Food and Agriculture. 99:235-243.

Mazón-Abarca, W.M., León-García, E., Ramírez De León, J.A, De la Cruz Medina, J., and García, H.S. 2022a. Effect of hot water treatment on ripening of tomato var. TA234 silenced with the *TomLoxB* gene. CYTA-Journal of Food. 20:13-24.

Mazón-Abarca, W.M., León-García, E., Ramírez De León, J.A., De la Cruz Medina, J., García, H.S. 2022b. Extension of postharvest life by application of edible coatings on tomatoes var. 234 with silencing of the *TomLoxb* gene. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 98: 355-364.

Nyanjage, M.O., Wainwright, H., and Bishop, C.F.H. 1999. Effects of hot-water treatment and storage temperature on electrolyte leakage of mangoes (*Mangifera indica* Linn.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 74: 566-572.

Pathare, P.B., and Al-Dairi, M. 2021. Bruise damage and quality changes in impact-bruised, stored tomatoes. Horticulturae. 7:113-132.

Pear, J.R., Sanders, R.A., Summerfelt, K.R., Martineau, B., and Hiatt W.R. 1993. Simultaneous inhibition of two tomato fruit cell wall hydrolases, pectinmethylesterase and polygalacturonase, with antisense gene constructs. Antisense Research and Development. 3:181-190.

Razavi, F., Hajilou, J., Dehgan, G., and Nagshi Band Hassani, R. 2017. Effect of postharvest oxalic acid treatment on ethylene production, quality parameters, and antioxidant potential of peach fruit during cold storage. Iran Journal of Plant Physiology. 7:2027-2036.

Razzaq, K., Khan, A.S., Malik, A.U., Shahid, M., and Ullah, S. 2015. Effect of oxalic acid application on Samar Bahisht Chaunsa mango during ripening and postharvest. LWT-Food Science and Technology. 63:152-160.

Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., and Hattori, T. 1997. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. Journal of Biotechnology. 53:103-113.

Smith, D.L., Abbott, J.A., and Gross, K.C. 2002. Down-regulation of tomato β-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. Plant Physiology. 129:1755-1762.

Sun, Q., Liu, L., Zhang, L., Lv, H., He, Q., Guo, L., Zhang, X., He, H., Ren, S., Zhang, N., Zhao, B., and Guo, Y.D. 2020. Melatonin promotes carotenoid biosynthesis in an ethylene-dependent manner in tomato fruits. Plant Science. 298:110580-110605.

Tarabih, M.E. 2014. Improving storability of Le Conte pear fruit using aminoethoxyvinylglycine (AVG) and oxalic acid (OA) under cold storage conditions. Asian Journal of Crop Science. 6:320-333.

Valero, D., Diaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillen, F., Martinez-Romero, D., and Serrano, M. 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59:5483-5489.

Velázquez-López, A.A, De la Cruz-Medina, J., García, H.S., Vela-Gutiérrez, G., Torres Palacios, C., and León-García, E. 2020. Lipoxygenase and its relationship with ethylene during ripening of genetically modified tomato (*Solanum lycopersicum*). Food Technology and Biotechnology. 58: 223-229.

Wang, Q., Lai, T., Qin, G., and Tian, S. 2009. Response of jujube fruits to exogenous oxalic acid treatment based on proteomic analysis. Plant and Cell Physiology. 50:230-242.

Wu, F., Zhang, D., Zhang, H., Jiang, G., Su, X., Qu, H., Jiang, Y., and Duan, X. 2011. Physiological and biochemical response of harvested plum fruit to oxalic acid during ripening or shelf-life. Food Research International. 44:1299-1305.

Zheng, X., Tian, S., Gidley, M.J., Yue, H., and Li, B. 2007a. Effects of exogenous oxalic acid on ripening and decay incidence in mango fruit during storage at room temperature. Postharvest Biology and Technology. 45:281-284.

Zheng, X., Tian, S., Meng, X., and Li, B. 2007b. Physiological and biochemical responses in peach fruit to oxalic acid treatment during storage at room temperature. Food Chemistry. 104:156-162.

Zheng, X. L., Tian, S. P., Gidley, M. J., Yue, H., Li, B.Q., Xu, Y., and Zhou, Z. W. 2007c. Slowing the deterioration of mango fruit during cold storage by pre-storage application of oxalic acid. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 82:707-714.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Ruminal degradation synchrony of crude protein and organic matter of forage species, as a preference determinant in free-range goats in the Sonoran Desert of Baja California Sur

Sincronía de la degradación ruminal de proteína cruda y materia orgánica de especies forrajeras como determinante de preferencia en cabras de libre pastoreo en el desierto sonorense de Baja California Sur

Rafael Ramírez-Orduña[1]*✉, José Ángel Armenta-Quintana[1], Juan Manuel Ramírez-Orduña[1]✉ and Raúl Avalos-Castro[2]✉

[1] Departamento de Ciencia Animal y Conservación del hábitat. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Apartado Postal 676. La Paz Baja California Sur. 2300. México.

[2] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). CIRNO-C.E. Todos Santos. La Paz, Baja California Sur.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the relationship between the preference index (IP) and synchrony (IS) of forage species from Baja California Sur. Samples of the 23 forage species of trees and shrubs were obtained to perform in situ digestibility analyzes using four Creole-Nubian goats. Collections were carried out in winter and spring of 2004, and summer and autumn of 2005. The extent of degradation per hour and total of 24 h was calculated from the amount of OM and PC degraded per hour; these data were used to calculate the IS. The seasonal PI data set was obtained from previously published information. A logistic regression model was used to explain the probability of occurrence of the IP with the IS. The regression model to explain the IP from the IS was significant and predictive for six species, being positive for *Adelia virgata*, *Amaratus palmeri*, *Haematoxilon brasiletto*, *Lippia palmeri* and *Prosopis sp.*, and negative for *Bursera microphyla*. For other tree species and legumes in general, the model was significant, but not predictive, therefore, it is necessary to include other factors to fit the model.

Keywords: range goats; arid zones; synchrony index; preference index; forage intake**.**

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la relación existente entre el índice de preferencia (IP) y sincronía (IS) de especies forrajeras de Baja California Sur. Se obtuvieron muestras de las 23 especies forrajeras de árboles y arbustos para realizar análisis de digestibilidad *in situ* utilizando para ello cuatro cabras con encaste de criollas-Nubio. Se llevaron a cabo colecciones en invierno y primavera del 2004 y verano y otoño de 2005. La extensión de degradación por hora y total de 24 h se calculó a partir de la cantidad de MO y PC degradados por hora; estos datos se utilizaron para calcular el IS. El conjunto de datos del IP estacional se obtuvo de información publicada previamente. Se utilizó un modelo de regresión logística para explicar la probabilidad de ocurrencia del IP con el IS. El modelo de regresión para explicar el IP a partir del IS fue significativo y predictivo para seis especies, siendo positiva para *Adelia virgata*, *Amaratus palmeri*, *Haematoxilon brasiletto*, *Lippia palmeri* y *Prosopis sp.*, y negativa para *Bursera microphyla*. Para otras especies arbóreas y las leguminosas en general, el modelo fue significativo, pero no predictivo, por lo tanto, es necesaria incluir otros factores para ajustar el modelo.

Palabras clave: cabras de agostadero; zonas aridas; índice de sincronización; índice de preferencia; consumo de forraje

INTRODUCTION

In harsh environments, the nutritional quality of pasture grazed by goats range from poor to medium quality (Mellado *et al*., 1991; Landau *et al*., 2000; Juarez *et al*., 2004; Chebli *et al*., 2021; Chebli *et al*., 2022), and its nutritional quality does not fall considerably during the dry season (Rutagwenda *et al*., 1989; Kababya *et al*., 1998; Ramirez-Orduña *et al*., 2008; Chebli *et al*., 2021; Chebli *et al*., 2022). The main advantage of desert goats over goats from temperate areas while digesting medium quality roughage, may relate to their ability to maintain higher microbial density on the particulate matter, hence a higher total ruminal fermentation rate and higher volatile fatty acids formation (Silanikove, 1996; Silanikove *et al*., 1993) which was related to their superior urea recycling capacity whereas digest diet below 8 % dietary protein concentration (Maltz *et al*., 1981; Silanikove *et al*., 1980; Silanikove, 1984). However, between 8 and 20 % dietary protein concentration, urea excretion is a function of protein intake with no special retention mechanism (Silanikove, 2000), but goats consuming diets in this range of protein concentration still depend on microbial efficiency to digest forage diet.

Some results with goats grazing the rangelands of the Sonoran Desert at Baja California Sur, Mexico, showed higher selection of browse legumes and cacti species at the end of spring, and higher selection over non-legumes and forbs during late summer, autumn and winter, although legume and non-legume trees and shrubs accounted for at least 50 % of goats diet all around the year. This selection resulted in a constant diet in truly digestible crude CP (11 ± 0.4 %) and metabolizable energy (2.4 ± 0.1 megacalories (Mcal)•kg^{-1}) throughout the year (Ramirez-Orduña *et al*., 2008). Other

*Author for correspondence: Rafael Ramirez Orduña
e-mail: rramirez@uabcs.mx
Recibido: July 10, 2023
Aceptado: December 3, 2023
Publicado: December 11, 2023

results in a similar area suggest that goats select diets with a high synchrony index (≥ 0.7) between organic matter (OM) and crude protein (CP) degradation (Armenta-Quintana *et al*., 2011), presumably to maintain good ruminal fermentation, microbial protein synthesis and feed utilization (Chumoawadee *et al*., 2006). However, it is not clear whether goats prefer forage species because they have intrinsically high IS in the rumen, or whether they select complementary species for a high IS diet. The objective of this study was to evaluate the relationship between the preference index (PI) of 23 forage species and their SI.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the "Palmar de Abajo" ranch within a 200 hectares (ha) rangeland and a stocking rate of 0.13 to 0.36 heads/ha, located in Baja California Sur, Mexico, at 23° 38´ 40´´ North latitude and 110° 18´ 07´´ West longitude and a 200 m above sea level elevation. Vegetation is considered as a sarcoculescent shrubland, composed mainly (92 %) of shrubs from 1 to 3 m, and trees from 4 to 10 m in height, and about 23 % of these are endemic species (León de Luz y Coria, 1992; Wiggins, 1980). The study area is in a subtropical zone characterized by a very dry and warm weather (BWhw. Köppen system), with an annual precipitation of about 182 mm occurring mainly from july through september (80 %), however some rainfall may occur in winter (INEGI, 2001), annual mean temperature is of 21.2 ºC and the soil is alkaline, regosol, eutric, calcareous and very permeable (INEGI, 2001).

About 2.5 to 6 kg of tree-boughs and shrubs were obtained and sun dried to obtain about 100 g of dry leave and twig samples of the following forage plants: *Adelia virgata*, *Amaranthus palmeri*, *Antigonon leptopus*, *Caesalpinia pannosa*, *Calliandra californica*, *Fouquieria diguetii*, *Haematoxylon brasiletto*, *Hymenoclea monogyra*, *Jatrohpa cinérea*, *Lysium torreyi*, *Ruellia peninsularis*, *Sapium biloculare* and *Solanum hindsianum*. Samples were dried in a forced air oven at 55°C for 72 h, ground to pass a 1mm screen in a Wiley mill to reduce all plant fragments to a uniform size. Two subsamples were taken and stored in plastic containers for *in situ* digestibility analyses. Samplings were carried out in winter (9-13 december) and spring (29 april to 5 may) of 2004, and summer (20-24 august) and autumn (24-28 november) of 2005.

Four range Creole-Nubio goats fitted with a ruminal cannula (37.1± 1.35 kg body weight), were used to estimate the rate and extent of OM and CP loss of each plant species sample at each sampling date. The animals were fed with *Medicago sativa* (14 % CP) twice a day (8:00 and 18:00 h) and had free access to water. About 3 g of DM of each plant species sample were placed into nylon bags (5 x 10 cm and 50 µm pore size). Duplicated nylon bags containing feed samples were incubated in the ventral sac of the rumen of each goat at designated time points (1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 100 h) and retrieved together at once. After incubation, bags were washed together through five 1-minute cold rinse cycles in a domestic washing machine and a final rinse in tap water. Zero-time (washing losses) was estimated by soaking unincubated three bags per sample in warm tap water at 39 °C for 20 min. After washing, bags and content were dried in an oven at 55°C for 48 h and reweighed. Residual samples were analyzed for OM and CP (AOAC, 2000). The *in-situ* digestibility (ISD) of OM and CP of each incubation time was calculated with the equation: *ISD* (%) = *[(Initial weight – final weight)/Initial weight]/ 100*.

The parameters of ruminal digestion of OM and CP were calculated by fitted the *ISD* data set to the equation (Ørskov and McDonald, 1979) $P = a+b(1-exp^{-kd \cdot t})$, where *P* is the cumulative amount degraded of OM or CP at time *t* (hours), *a* is the soluble fraction of the sample that is lost during washing, *b* is the insoluble fraction that is potentially degraded in the rumen and *kd* is the constant rate of degradation of the fraction *b*.

Additional data set of seasonal degradation kinetic parameters of forage species from the same rangelands were obtained from previous works (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; 2003b), this data set include the species *Acacia peninsularis*, *Cercidium floridum*, *Mimosa xanti*, *Pithecellobium confine*, *Prosopis sp*., *Bursera microphylla*, *Cyrtocarpa edulis*, *Lippia palmeri*, *Opuntia cholla* and *Turnera diffusa*. Kinetic parameters of digestion characterize the intrinsic properties of feeds that limit their availability to ruminants, and can be used to simulate aspects of the forage to understand the digestion processes (Mertens, 1996).

From the two data set, the hourly and total (24 h) effective degradation (ED) of the OM (EDOM) and CP (EDCP) was calculated using the equation $ED = a + \{[(b \bullet kd)/(kd+kp)][1-exp^{(kd+kp) \cdot t}]\}$ (Ørskov and McDonald, 1970), where *kp* represents the fractional passage rate from the rumen. The EDOM and EDCP were estimated using a passage rate of 5 %/h (*kp* = 0.05). The hourly EDOM and EDCP for each sample were calculated as the difference among degraded material at successive hours. From the calculated hourly EDOM and EDCP, a synchrony index (SI) of OM to CP degradation was calculated as described by Sinclair *et al*. (2000), with $SI = \{25-\Sigma 1\text{-}24 (\sqrt{[(25\text{-hourly N/OM})^2]})/24\}/25$, where 25 = 25 g of N/kg of OM truly digested in the rumen, which is assumed to be the optimal ratio (Czerkawski. 1986). A synchrony index of 1.0 represents perfect synchrony between OM and CP release throughout digestion time and values less than 1.0 indicate the degree of asynchrony.

Seasonal data set of preference index for the individual 23 species was obtained from published information (Ramirez-Orduña *et al*., 2008; Armenta-Quintana *et al*., 2011). For both data set, preference index (PI) of goats for plant species were established with the arithmetic range by the quotient of the percent of each plant species in diet, and the percentage of each plant species in the study area according to the Ivlev´s selectivity index (Strauss, 1979) PI = Fi – Hi / Fi + Hi, were Fi = percent forage consumed by the animal of a species, Hi = total percentage of forage available for one specie. An index of +1.0 indicates that the specie was preferred, 0 indicate that the specie was preferred according to its availability, and -1.0 indicates that the specie was rejected by goats.

For the care of animals and procedures, the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 for the care of animals was considered, as well as the law for the protection of domestic animals for Baja California Sur and the recommendations of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Autonomous University of Baja California Sur.

Data of effective degradation and synchrony index of OM and CP degradation were subjected to analysis of variance with sampling date as the main effect. Means were separated using Tukey´s test. Considering a maximum of 50 % of available forage, PI values used were dichotomized to develop a binary logistic regression model to explain the probability of occurrence preference with the SI as independent variable. PI values higher than -0.33 were codified as 1 and lower values were codified as cero, in accordance with Stuth (1991). The ROA´s statistical efficiency and the Hosmer and Lemeshow procedures were used to know the goodness of fit of the model. All tests were performed with alpha ≤ 0.05 (SPSS 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Results about EDOM and EDCP of the thirteen studied species are shown in Table 1, seasonal means of SI of this species and additional calculated data for another ten plant species are shown in Table 2. Calculated PI by season for each 23 species are shown in Table 3 and results of binary logistic regression between SI and PI by plant species, season and plant type are shown in table 4.

Acacia peninsularis, *Adelia virgata*, *Amaranthus palmeri*, *Haematoxylon brasiletto*, *Lippia palmeri* and *Prosopis sp.,* had a significant and positive relation between PI and SI (Table 4). *Acacia* species are known to be an important protein source in many area around the world, showing CP content from 12 to 18 % on DM basis depending on area, stage of growth and aridity (Ben Salem *et al*., 2002; Mousa, 2011; Soltan *et al*., 2012; Ngambu *et al*., 2013; Quiroz-Cardoso *et al*., 2015; Mabeza *et al*., 2017). Accordingly, *Acacia peninsularis* is an endemic specie from Baja California Sur, Mexico, containing 11 to 15% CP throughout the year; moreover, *Acacia peninsularis* EDOM and EDCP were no different between seasons (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b). In this study the calculated mean SI was high and constant throughout the year (Table 2). According to the calculated results, this specie was preferred nearest their availability all year (Table 3). Logistic regression analyses were highly significant indicating a 6.7 increase in the probability of preference when SI increase, however, even when the R^2 was high, the highly significance of the Hosmer and Lemeshow Chi^2 procedure indicate a lack of fit of the model and that other factors should be considered to explain the preference of this plant (Table 4). The presence of phenolic compounds in *Acacia* species has a negative effect on their nutritional value and intake by livestock (Degen *et al*., 1998). Similarly, tannins have been attributed as one of the major causes of their limited use as a livestock fodder (Makkar, 1993; Kumar and D'Mello, 1995). From 2 - 4 % tannins in the diet protects protein from rumen degradation and increases the absorption of essential amino acids, whereas 4 - 10% depresses voluntary feed intake, reduce palatability and decrease digestibility, inhibit digestive enzymes and could be toxic to rumen micro-organisms (Ku-

Tabla 1. Contenido de materia orgánica (% de MS), proteína bruta (% de MS) y características de degradación efectiva (%) en especies vegetales seleccionadas por cabras pastoreando en un matorral sarcocaulescente de Baja California Sur, México.
Table 1. Content of organic matter (% of DM), crude protein (% of DM) and effective degradation characteristics (%), in plant species selected by ranging goats grazing on a sarcocaulescent shrubland of Baja California Sur, Mexico.

Plant Specie	OM	Effective degradation of OM				CP	Effective degradation of CP			
	Anual Mean	Spring	Summer	Fall	Winter	Anual Mean	Spring	Summer	Fall	Winter
Adelia virgata	91.8	81.1^{a}	78.3^{b}	80.5^{ab}	80.2^{ab}	11.3	77.2^{ab}	79.3^{a}	76.0^{b}	78.1^{ab}
Amaranthus palmeri	81.0	54.1^{b}	53.3^{b}	63.3^{a}	51.9^{b}	10.6	80.9^{a}	71.3^{c}	75.9^{b}	75.6^{b}
Antigonon leptopus	87.8	61.3^{a}	54.8^{ab}	54.7^{ab}	51.5^{b}	14.5	51.8^{b}	58.6^{a}	48.7^{b}	51.7^{b}
Caesalpinia pannosa	91.8	77.2^{bc}	80.7^{a}	75.3^{c}	79.2^{ab}	11.3	29.6^{b}	51.7^{a}	27.8^{b}	30.0^{b}
Calliandra californica	92.5	43.3^{b}	54.0^{a}	41.9^{b}	43.6^{b}	10.3	81.4^{a}	81.5^{a}	83.8^{a}	70.3^{b}
Fouquieria diguetii	89.0	60.2^{ab}	66.1^{a}	48.4^{c}	56.1^{b}	4.9	40.1^{a}	29.9^{a}	17.4^{b}	12.9^{b}
Haematoxylon brasiletto	91.2	62.4^{b}	66.0^{a}	52.6^{c}	61.0^{b}	8.6	47.0^{b}	64.5^{a}	42.0^{c}	44.3^{bc}
Hymenoclea monogyra	87.8	72.2^{a}	71.4^{a}	66.0^{b}	69.8^{ab}	15.8	79.6^{a}	74.2^{b}	56.7^{d}	66.4^{c}
Jatropha cinerea	83.0	76.9^{a}	69.4^{b}	72.2^{b}	72.4^{b}	14.7	80.3^{a}	67.4^{b}	80.1^{a}	78.6^{a}
Lysium torreyi	68.2	72.5^{b}	78.8^{a}	68.5^{b}	69.5^{b}	11.1	81.8^{a}	77.5^{b}	76.7^{b}	73.6^{b}
Ruellia peninsularis	81.0	61.7^{b}	71.4^{a}	64.4^{b}	64.2^{b}	9.0	72.6^{a}	73.7^{a}	63.3^{b}	58.8^{b}
Sapium biloculare	91.9	80.4^{b}	82.6^{ab}	84.5^{a}	83.5^{ab}	9.3	70.4^{c}	80.5^{ab}	80.9^{a}	75.1^{bc}
Solanum hindsianum	90.5	55.0^{a}	47.7^{b}	56.2^{a}	51.8^{b}	12.8	82.4^{b}	83.5^{a}	78.1^{c}	72.7^{d}

$^{a, b, c, d}$ Different literals within rows are statistically different (P < 0.05).

Tabla 2. Índice de sincronía calculado entre la degradación de la materia orgánica y la proteína cruda en especies vegetales seleccionadas por cabras pastoreando sobre un matorral sarcocaulescente de Baja California Sur, México.
Table 2. Calculated synchrony index between the degradation of organic matter and crude protein, in plant species selected by ranging goats grazing on a sarcocaulescent rangeland from Baja California Sur, Mexico.

Plant Specie	Synchrony Index				Annual Mean	Standard Deviation
	Spring	Summer	Fall	Winter		
Acacia peninsularis	0.73^{a}	0.79^{a}	0.79^{a}	0.78^{a}	0.77	0.07
Adelia virgata	0.66^{a}	0.65^{a}	0.71^{a}	0.69^{a}	0.68	0.04
Amaranthus palmeri	0.92^{b}	0.97^{a}	0.80^{d}	0.88^{c}	0.87	0.06
Antigonon leptopus	0.84^{b}	0.91^{a}	0.83^{b}	0.75^{c}	0.83	0.06
Bursera microphyla	0.69^{ab}	0.46^{b}	0.70^{a}	0.83^{a}	0.67	0.25
Caesalpinia pannosa	0.60^{b}	0.08^{c}	0.89^{a}	0.22^{c}	0.45	0.34
Calliandra californica	0.96^{a}	0.31^{b}	0.90^{ab}	0.90^{ab}	0.83	0.31
Cercidium floridum	0.80^{ab}	0.75^{b}	0.86^{a}	0.81^{ab}	0.80	0.09
Cirtocarpa edulis	0.73^{b}	0.88^{a}	0.91^{a}	0.87^{a}	0.85	0.12
Fouquieria diguetii	0.82^{a}	0.84^{a}	0.24^{b}	0.95^{a}	0.74	0.28
Haematoxylon brasiletto	0.70^{ab}	0.44^{ab}	0.93^{a}	0.10^{b}	0.65	0.44
Hymenoclea monogyra	0.83^{a}	0.75^{b}	0.74^{bc}	0.67^{c}	0.75	0.07
Jatropha cinerea	0.80^{d}	0.96^{a}	0.84^{c}	0.89^{b}	0.87	0.06
Lippia palmeri	0.77^{a}	0.74^{a}	0.74^{a}	0.77^{a}	0.76	0.14
Lysium torreyi	0.79^{a}	0.64^{a}	0.75^{a}	0.81^{a}	0.74	0.11
Mimosa xantii	0.82^{a}	0.76^{a}	0.84^{a}	0.84^{a}	0.81	0.11
Opuntia cholla	0.79^{a}	0.77^{a}	0.83^{a}	0.84^{a}	0.81	0.11
Pitecellobium confine	0.79^{a}	0.80^{a}	0.87^{a}	0.85^{a}	0.83	0.11
Prosopis sp.	0.73^{a}	0.73^{a}	0.74^{a}	0.73^{a}	0.73	0.10
Ruellia peninsularis	0.74^{a}	0.82^{a}	0.82^{a}	0.63^{b}	0.75	0.09
Sapium biloculare	0.63^{ab}	0.82^{a}	0.29^{b}	0.51^{ab}	0.58	0.28
Solanum hindsianum	0.66^{ab}	0.79^{a}	0.29^{b}	0.63^{ab}	0.59	0.27
Turnera difusa	0.60^{a}	0.66^{a}	0.74^{a}	0.74^{a}	0.69	0.18
Mean	0.75^{ab}	0.73^{b}	0.78^{a}	0.77^{a}	0.76	0.19
Standar Deviation	0.13	0.22	0.23	0.18		

$^{a, b, c}$ Different literals within rows are statistically different ($P < 0.05$)

mar and Vaithiyanathan, 1990; Terrill *et al*., 1992; Barry and McNabb, 1999). *Acacia peninsularis* was found to contain 6.8 to 7.6 % condensed tannins (Ramírez-Orduña *et al*., 2003b).

Information about *Adelia virgata* and *Amaranthus palmeri* as a fodder for goats is scarse. *Adelia virgata* had a lower EDOM in summer but lower EDCP in fall (Table 1), however had a medium to high SI throughout the year (Table 2). The analyzed data about preference by goats indicate no statistical difference between seasons (Table 3). The logistic regression model indicates that an increase in SI determines significatively an increase in the probability of preference by 8.3 times (Table 4). On the other hand, *Amaranthus palmeri* had lower EDCP in summer but higher EDOM in fall (Table 1), with high SI values all year with seasonal differences, being higher in summer (Table 2), however was highly preferred in spring (Table 3). For this plant, an SI increase increased significatively almost 20 times the preference, and the variance explained by SI was significant, being a good predictor of PI (Table 4).

During fall, *Haematoxylon brasiletto* had a lower EDOM and EDCP (Table 1), but a higher SI and PI (Table 2 and 3 respectively), therefore the logistic regression was significant indicating that an increase in SI determine an increase of 16.4 times in the probability of preference, in this case the Hosmer

Tabla 3. Índice de preferencia (PI) y valor dicotomizado (DV) de especies de plantas seleccionadas por cabras pastoreando sobre un matorral sarcocaulescente de Baja California Sur, México.
Table 3. Preference index (PI) and dichotomized value (DV) of plant species, selected by ranging goats grazing on a sarcocaulescent rangeland from Baja California Sur, Mexico.

Plant Specie	Spring		Summer		Fall		Winter	
	PI	DV	PI	DV	PI	DV	PI	DV
Acacia peninsularis	0.07[a]	1	0.21[a]	1	-0.18[a]	1	-0.15[a]	1
Adelia virgata	0.10[a]	1	0.39[a]	1	0.25[a]	1	0.16[a]	1
Amaranthus palmeri	1.0[a]	1	0.39[ab]	1	0.10[b]	1	0.53[ab]	1
Antigonon leptopus	-0.02[a]	1	-0.15[a]	1	-0.55[a]	0	-0.01[a]	1
Bursera microphyla	-1.0[b]	0	-0.62[a]	0	-1.0[b]	0	-0.85[b]	0
Caesalpinia pannosa	-0.89[a]	0	-1.0[a]	0	-1.0[a]	0	-0.93[a]	0
Calliandra californica	-0.24[a]	1	-0.95[b]	0	-0.96[b]	0	-0.72[b]	0
Cercidium floridum	-0.12[a]	1	-0.80[b]	0	-0.56[b]	0	-0.14[a]	1
Cirtocarpa edulis	-0.86[c]	0	-0.39[b]	0	-0.10[a]	1	-0.93[c]	0
Fouquieria diguetii	-0.57[ab]	0	-0.39[a]	0	-0.85[b]	0	-0.43[a]	0
Haematoxylon brasiletto	-0.15[a]	1	-0.15[a]	1	0.02[a]	1	-0.23[a]	1
Hymenoclea monogyra	-0.46[a]	0	-0.35[a]	0	-0.40[a]	0	-0.07[a]	1
Jatropha cinerea	-0.77[b]	0	-0.84[b]	0	-0.72[ab]	0	-0.53[a]	0
Lippia palmeri	-1.0[c]	0	-0.26[b]	1	-0.07[b]	1	0.74[a]	1
Lysium torreyi	-0.39[a]	0	-0.13[a]	1	-0.19[a]	1	-0.30[a]	1
Mimosa xantii	0.0[ab]	1	-0.76[c]	0	0.22[a]	1	-0.28[b]	1
Opuntia cholla	-0.17[a]	1	-0.61[b]	0	-0.16[a]	1	-0.39[ab]	0
Pithecellobium confine	0.07[a]	1	-0.94[b]	0	-0.15[a]	1	0.10[a]	1
Prosopis sp.	-0.25[a]	1	-0.34[a]	0	-0.27[a]	1	-0.25[a]	1
Ruellia peninsularis	-1.0[b]	0	-0.35[a]	0	-0.34[a]	0	-0.65[ab]	0
Sapium biloculare	-0.50[a]	0	-0.75[b]	0	-0.71[ab]	0	-1.0[c]	0
Solanum hindsianum	-0.56[a]	0	-0.06[a]	1	-0.04[a]	1	-0.31[a]	1
Turnera difusa	-1.0[a]	0	-1.0[a]	0	-0.76[a]	0	-0.69[a]	0

[a, b, c] Different literals within rows are statistically different ($P < 0.05$).

and Lemeshow was not significant indicating a high model goodness fit (Table 4). *Lippia palmeri* EDOM and EDCP was lower in spring and summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), however their SI was high and constant throughout the year (Table 2), but was most preferred in fall (Table 3). There was a significative relation between SI and PI, however the R^2 of the logistic regression was low, but the Hosmer and Lemeshow results indicate an acceptable goodness of fit, and the model indicates that an increase in SI determines an increase in the probability of preference by almost three times (Table 4).

Prosopis sp., had a constant EDOM, EDPC (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b) and SI throughout the year (Table 2), with a constant high SI but negative PI, indicating that the preference of this specie is low or tend to be rejected, overall in summer (Table 3), however there was a significative relation between SI and PI, and even when the R^2 of the logistic model was low, the Hosmer and Lemeshow results were no significant indicating that an increase in SI determines an increase in the probability of preference by 3 times within an acceptable goodness of fit (Table 4).

Conversely to previous results, *Bursera microphyla*, *Cyrtocarpa edulis* and *Fouqieria diguetii* had a negatively significant relation between PI and SI. *Bursera microphyla* is a specie with a higher EDOM and EDCP during spring (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b) but lower SI (Table 2), and its PI was higher during summer (Table 3), therefore the logistic regression analyses between SI and PI were negative and highly significant, and the goodness of fit of the model was high (Table 4).

Cyrtocarpa edulis had a lower EDOM and EDCP in spring and summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), their SI was lower during spring, but the SI values were over 0.70 all year (Table 2). This specie seems to be most preferred in fall (Table 3), logistic regression analy-

Tabla 4. Análisis de regresión logística para explicar el índice de preferencia a partir del índice de sincronía entre la degradación de materia orgánica y proteína cruda para especies vegetales, época y tipo de planta seleccionadas por cabras pastoreando en un matorral de Baja California Sur, México.
Table 4. Logistic regression analyses to explain the preference index, from the synchrony index, between the degradation of organic matter and crude protein for plant species, season and plant type selected by goats ranging on a shrubland from Baja California Sur, Mexico.

Main effect	ROA (Chi²)	Goodness of Fit[1]		Model summary					
		R^2	Chi²	B	TE	Wald	Odd Ratio (OR)	Confidence Interval 9 5% for OR	
								Lower	Higher
Plant specie									
Acacia peninsularis	20.3***	0.46	31.6***	1.9	0.5	15.7***	6.7	2.6	17.2
Adelia virgata	6.5**	0.45	6.3ns	2.1	0.9	5.1*	8.3	1.3	52.2
Amaranthus palmeri	11.5***	0.78	11.1ns	3.0	1.3	5.6*	19.8	1.7	233.2
Antigonon leptopus	2.2ns	0.17	10.6ns	0.9	0.6	2.1ns	2.5	0.7	9.0
Bursera microphyla	47.3***	0.85	9.6ns	-4.7	1.2	14.6***	0.0	0.0	0.1
Caesalpinia pannosa	2.8ns	0.28	12.1ns	-1.1	0.7	2.4ns	0.3	0.1	1.3
Cercidium floridum	3.2ns	0.09	11.3ns	-0.6	0.4	3.1ns	0.5	0.3	1.1
Cyrtocarpa edulis	10.1**	0.25	15.2*	-1.1	0.4	8.9**	0.3	0.2	0.7
Fouquieria diguetii	11.7***	0.75	16.1*	-2.8	1.2	6.1*	0.1	0.0	0.6
Haematoxylon brasiletto	7.1**	0.68	4.5ns	2.8	1.4	4.1*	16.4	1.1	248.2
Hymenoclea monogyra	1.3ns	0.10	6.6ns	-0.8	0.7	1.2ns	0.5	0.1	1.8
Lippia palmeri	6.8**	0.18	10.8ns	1.0	0.4	6.3*	2.8	1.2	6.2
Lysium torreyi	0.0ns	0.00	3.6ns	0.1	0.7	0.0ns	1.1	0.3	4.4
Mimosa xantii	3.5ns	0.09	15.0*	0.7	0.4	3.3ns	1.9	1.0	4.0
Opuntia cholla	0.4ns	0.01	18.2*	-0.2	0.4	0.4ns	0.8	0.4	1.6
Pithecellobium confine	0.5ns	0.01	20.0**	0.3	0.3	0.5ns	1.3	0.6	2.5
Prosopis sp	7.1**	0.18	8.6ns	1.1	0.4	6.5*	3.0	1.3	6.8
Ruellia peninsularis	3.6ns	0.27	7.4ns	-1.4	0.8	3.2ns	0.3	0.1	1.1
Solanum hindsianum	0.0ns	0.00	1.6ns	0.1	0.8	0.0ns	1.1	0.3	5.2
Season									
Winter	0.64ns	0.00	23.4**	-0.15	0.19	0.64ns	0.85	0.58	1.2
Spring	0.16ns	0.00	20.7**	-0.08	0.20	0.16ns	0.92	0.62	1.3
Summer	21.8***	0.17	6.0ns	-1.0	0.22	20.0***	0.36	0.23	0.5
Fall	0.01ns	0.00	5.7ns	0.02	0.19	0.01ns	1.02	0.70	1.4
Plant type									
Non-leguminous	36.1***	0.11	8.8ns	-0.8	0.13	34.2***	0.4	0.34	0.5
Leguminous	7.3**	0.03	20.2**	0.4	0.15	7.2**	1.5	1.11	2.0

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, ns: not significant. [1] Negelkerke R^2 and Hosmer and Lemeshow Chi².

ses were significant but the relation between SI and PI was negative and the R^2 was low, and the procedure of Hosmer and Lemeshow was significant indicating a lack of fit of the model, thus other factors should be considered (Table 4). Similarly, *Fouqieria diguetii* has a lower EDOM and EDCP (Table 1), SI (Table 2) and PI (Table 3) even when ROA analyses and Wald value were significant and the Nagelkerke R^2 was high, the Hosmer and Lemeshow procedure was significant indicating a lack of fit in the relation between SI and PI and therefore, other factors could help explain the preference of this specie (Table 4).

For ten species there were no relation between PI and SI. *Antigonon leptopus* had a lower EDOM in winter and higher EDCP (Table 1) and SI in summer, it was less preferred mostly in fall (Table 3) even when this plant had a high SI through the year (Table 2). *Caesalpina pannosa* had a higher EDOM and EDCP during summer (Table 1), however in this season had lower SI (Table 2), it was refused rather than preferred all the year (Table 3) and animals preferred it in a very small amount during winter and spring, therefore a reasonable dichotomizing process and logistic regression analysis was not possible. *Cercidium floridum* EDOM and EDCP was low during summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), also had a lower SI in this season (Table

2) when was less preferred (Table 3). *Hymenoclea monogyra* EDOM and EDPC was high in spring (Table 1) but was more preferred in winter (Table 3), consequently there was no relationship between SI and PI (Table 4). *Lysium torreyi* EDOM was higher in summer but EDCP was higher in spring (Table 1); even when the SI was high and constant in all seasons (table 2) this specie was more preferred during summer and fall (Table 3), therefore the logistic regression indicates no relation between SI and PI (Table 4). *Mimosa xantii* had a constant EDOM in all seasons but EDCP was lower in summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), however in this season its SI was not affected significantly (Table 2) but was less preferred (Table 3), and there was not a relation between SI and PI (Table 4).

Previous local data indicated that *Opuntia cholla* EDOM was constant between seasons, but their EDCP was lower in summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), therefore in this study their calculated SI was high and constant all year (Table 2) but was less preferred during summer (Table 3). *Phitecellobium confine* preference was higher during winter and spring (Table 3), in this seasons EDOM was higher but EDCP (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b) and SI (Table 2) did not change during the year, hence there was no relation between SI and PI (Table 4). *Ruellia peninsularis* had a higher EDOM in summer and higher EDCP in spring and summer (Table 1) but was rejected practically during spring (Table 3), however its SI was high through the year with a significant reduction during winter (Table 4). *Solanum hindsianum* had a lower EDOM in summer and winter and high EDCP in summer (Table 1), however it had a lower SI in fall (Table 2) and its PI was coded 0 in spring (Table 3), therefore there was no a relation between SI and PI (Table 4).

Calliandra californica had a higher EDOM during summer but lower EDCP during winter (Table 1), however this specie had a higher SI during spring (Table 2), and it was most preferred in this season (Table 3). *Jatropha cinerea* had a higher EDOM in spring but during summer had lower EDCP (Table 1), PI (Table 3) and higher SI (Table 2), animals preferred it in a very small amount all year, therefore for these species a reasonable dichotomizing process and logistic regression analysis was not possible. Similarly, *Sapium biloculare* had a lower EDOM and EDCP (Table 1) but was most preferred during spring (Table 3), also had a lower SI during fall (Table 2), nevertheless, no dichotomizing process and logistic regression analyses was possible. In the summer, *Turnera diffusa* EDOM was lower than in spring and EDCP was lower in spring and summer (Ramirez-Orduña *et al*., 2003a; Ramirez-Orduña *et al*., 2003b), It had a SI without significant variation all year (Table 2), but this specie was less preferred in fall and winter or was rejected in spring and summer (Table 3); therefore, a logistic regression analysis was not possible.

Total data analyses of logistic regression showed a significant relation between SI and PI (ROA $P < 0.01$), there was a lack of fit of the model ($R^2 = 0.015$, Hosmer and Lemeshow $P < 0.05$). In addition, the model suggests a negative relation between PI and SI (OR = 0.76, Wald 7.5, $P < 0.01$). Seasonal analyses of data were not significant, except for the summer ($P < 0.001$) where the model showed a goodness of fit and predictive value ($R^2 = 0.17$, Hosmer and Lemeshow $P > 0.05$), however, the relation was negative (OR = 0.36, Wald 20, $P < 0.001$).

Ramírez-Orduña *et al*. (2008) found that during summer, autumn and winter, diets of goats were composed mainly of non-legumes trees and shrubs such as *Adelia virgata*, *Manguifera indica*, *Jatropha cinerea*, *Lissium torreyi* and *Fouquieria diguetii*, followed by forbs, legumes and cacti, and that dietary NDF was lowest in late spring and summer. Nonstructural carbohydrates content was highest in spring and late summer, CP was lowest during spring and early summer, similar responses to those reported by Ramírez-Orduña *et al*. (2003a) in five legumes browsed by range goats, where low CP, low NDF and high non-structural carbohydrates (NSC) in spring and summer were related to higher consumption of fruits of cacti, and fruits and flowers of legumes trees and shrubs, such diet characteristics suggests an asynchronous diet.

In accordance with these results, plant type analyses show a significant relation between SI and PI (Table 4). This relation was inverse for non-legumes but direct for legumes species, nevertheless for legumes the model was not predictive ($R^2 = 0.3$, Hosmer and Lemeshow $P < 0.01$). Legumes species are higher in CP and degraded protein than non-legumes in spring and summer (Ramirez-Orduña *et al*., 20003), these results indicate that legumes may be preferred in accordance with their synchrony of degradation characteristics and that other factors such as secondary compounds may be more important in determine the preference of this plant type.

CONCLUSIONS

According to our results, goats may prefer a few forage species or plant type because their high synchrony of OM and CP availability in the rumen. However, some other plant species or type shown an inverse relationship, therefore, goats may select complementary plant species or type throughout the year to obtain a diet with high synchrony index, additionally, it appears that other factors may affect the preference in more determinant form than the ruminal availability of CP and OM, mainly in legumes species and during the dry season.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding this manuscript.

REFERENCES

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2000. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Washington. DC. USA.

Armenta-Quintana, J.A., Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R.G. and Romero-Vadillo, E. 2011. Organic matter and crude protein ruminal degradation synchrony in diets selected by range goats. Tropical and Subtropical Agroecosystems.

14: 109-117. https://pdfs.semanticscholar.org/ea40/da4b0d7b8ab821a73660d4fd185df3fe5705.pdf

Barry, T.N. and McNabb, W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. British Journal of Nutrition. 81 (4): 263-272. https://doi.org/10.1017/S0007114599000501

Ben Salem, H., Nefzaoui, A. and Ben Salem, L. 2002. Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus* indica f. inermis and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. Animal Feed Science and Technology 96 (1) :15-30. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00338-8

Chebli, Y., El Otmani, S., Hornick, J.-L., Bindelle, J., Cabaraux, J.-F. and Chentouf, M. 2022. Estimation of grazing activity of dairy goats using accelerometers and global positioning system. Sensors 2022, 22, 5629. https://doi.org/10.3390/s22155629

Chebli, Y., El Otmani, S., Chentouf, M., Hornick, J.-L. and Cabaraux, J.-F. 2021. Temporal variations in chemical composition, in vitro digestibility, and metabolizable energy of plant species browsed by Goats in southern mediterranean Forest Rangeland. Animals 11: 1441. https://doi.org/10.3390/ani11051441

Chumpawadee, S., Sommart, K., Vongpralub, T. and Pattarajinda, V. 2006. Effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on ruminal fermentation. microbial protein synthesis, blood urea nitrogen and nutrient digestibility in beef cattle. Asian Australian Journal of Animal Science 19 (2): 181-188. https://doi.org/10.5713/ajas.2006.181

Czerkawski, J.W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergammon Press. Oxford. pp. 226-234. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025486-9.50024-4

Degen, A.A., Mishorr, T., Makkar, H.P.S., Kam, M., Benjamin, R.W., Becker, K. and Schwartz, H.J. 1998. Effect of *Acacia saligna* with and without administration of polyethylene glycol on dietary intake in desert sheep. Animal Science. 67 (3): 491-498. https://doi.org/10.1017/S1357729800032914

INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Historia. 2001. Carta actual del uso del suelo y vegetación primaria de Baja California Sur, México. https://www.inegi.org.mx/temas/ususuelo/

Juárez, R.A.S., Cerrillo, S.M.A., Meza-Herrera, C.A. and Nevarez, C.G. 2004. Diet composition, intake, plasma metabolites, reproductive and metabolic hormones during pregnancy in goats under semi-arid grazing conditions. Journal of Agricultural Science. 142 (6): 697-704. https://doi.org/10.1017/S0021859605004879

Kababya, D., Perevolotsky, A., Bruckental, I. and Landau, S.Y. 1998. Selection of diets by dual-purpose Mamber goats in Mediterranean woodland. Journal of Agricultural Science. 131 (2): 221-228. https://doi.org/10.1017/S0021859698005577

Kumar, R. and D'Mello. J.P.F. 1995. Anti-nutritional factors in forage legumes. In: Tropical Legumes in Animal Nutrition. D'Mello. J.P.F. and C. Devendra (Eds.). CAB International. U.K. pp 95-133. https://goo.gl/vLfALu

Kumar, R., Vaithiyanathan, S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Animal Feed Science and Technology. 30 (1): 21-38. https://doi.org/10.1016/0377-8401(90)90049-E

Landau, S., Perevolotsky, A., Bonfil, D., Barkai, D. and Silanikove, N. 2000. Utilization of low quality resources by small ruminants in Mediterranean agro-pastoral system: the case of scrubland and aftermath cereal stubbles. Livestock Production Science. 64 (1): 39-49. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00174-3

León de la Luz, J.S. y Coria, R. 1992. Flora iconográfica de Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur A.C.

Mabeza, G., E. Masama, I. and Mpofu, D.T. 2017. Evaluation of browse legume diets (*Acacia angustissima*, *Leucaena trichandra* and *Calliandra calothyrsus*) on feed intake and growth of goats. Universal Journal of Agricultural Research. 5(6): 350-354. https://doi.org/10.13189/ujar.2017.050606

Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K. and Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of the Science of Food and Agriculture. 61 (2):161-165. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610205

Maltz, E., Silanikove, N. and Shkolnik, A. 1981. Renal performance in relation to water and nitrogen metabolism in Bedouin goats during lactation. Comparative Biochemistry & Physiology. 70A: 145-147. https://www.academia.edu/34257946/Renal_performance_in_relation_to_water_and_nitrogen_metabolism_in_bedouin_goats_during_lactation

Mellado, M., Foote, R.H., Rodríguez, A. and Zarate, P. 1991. Botanical composition and nutrient content of diets selected by goats grazing on desert grassland in northern México. Small Ruminant Research. 6 (2): 141-150. https://doi.org/10.1016/0921-4488(91)90017-K

Mertens, D.R., 1996. Rate and extent of digestion. In: Quantitative Aspect of Ruminant Digestion and Metabolism. Forbes J.M. and J. France (Ed) CAB International. U.K. pp 13-51. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9780851998145.0000

Mousa, M.R.M. 2011. Effect of feeding *Acacia* as supplements on the nutrient digestion. growth performance carcass traits. and some blood constituents of Awassi lambs under the conditions of north Sinai. Asian Journal of Animal Science. 5 (2):102-117. https://doi.org/10.1016/0921-4488(91)90017-K

Ngambu1, S., Muchenje, V. and Marume, U. 2013. Effect of *Acacia karroo* supplementation on growth. ultimate pH. colour and cooking losses of meat from indigenous Xhosa Lop-eared goats. Asian Australian Journal of Animal Science. 26 (1):128-133. https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12046

Ørskov, E.R. and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. Journal of Agriculture Science. 92 (2): 499-503. https://doi.org/10.1017/S0021859600063048

Quiroz-Cardoso, F., Rojas-Hernández, S., Olivares-Pérez, J., Hernández-Castro, E., Jiménez-Guillén, R., Córdova-Izquierdo, A., Villa-Mancera, A. and Abdel-Fattah, S. 2015. Composición nutricional. consumo e índices de palatabilidad relativa de los frutos de tres acacias en la alimentación de ovejas y cabras. Archivos de medicina veterinaria. 47 (1): 33-38. http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000100007

Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R.G., Gómez-Meza, M.V., Armenta-Quintana, J.A., Ramírez-Orduña, J.M., Cepeda-Palacios, R. and Ávila-Sandoval, J.M. 2003a. Seasonal dynamics of organic

matter digestion in browse species from Baja California Sur México. Journal of Applied Animal Research. 24 (2003): 65-78. DOI: https://doi.org/10.1080/09712119.2003.9706436

Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R.G., Gómez-Meza, M.V., Armenta-Quintana, J.A., Ramírez-Orduña, J.M., Cepeda-Palacios, R. and Ávila-Sandoval, J.M. 2003b. Seasonal dynamics of ruminal crude protein digestion of browse species from Baja California Sur México. Interciencia. 28 (7): 408-414. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000700009&lng=es&nrm=iso

Ramírez-Orduña, R., Ramírez, R.G., Romero-Vadillo, E., González-Rodríguez, H., Armenta-Quintana, J.A., Avalos-Castro, R. 2008. Diet and nutrition goats on a sarcocaulescent shrubland from Baja California Sur, México. Small Ruminant Research. 76 (3): 166-176. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.020

Rutawenda, T., Kaske, M., Engelhardt, M.V., Lechner-Doll, M., Schultka, W. and Schwartz, H.J. 1989. Adaptation Strategies of camels on a thornbush savannah pasture: comparison with other domestic animals. CIHEAM Options Méditerranéennes Série Séminaires. (2): 69-73. http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=CI000429

Silanikove, N., Tagari, H. and Shkolnik, A. 1980. Gross energy digestion and urea recycling in the desert black Bedouin goats. Comparative Biochemistry & Physiology. 67A (1980): 215-218. http://publicationslist.org.s3.amazonaws.com/data/silanikove/ref-42/CBP80.pdf

Silanikove, N., Tagari, H. and Shkolnik, A. 1993. Comparison of rate passage fermentation rate and efficiency of digestion of high fiber diet in desert black Bedouin goats as compared to Swiss Saanen goats. Small Ruminant Research. 12 (1): 45-60. https://doi.org/10.1016/0921-4488(93)90037-I

Silanikove, N. 1984. Renal excretion of urea in response to changes in nitrogen intake in desert (black bedouin) and nondesert (Swiss Saanen) goats. Comparative Biochemistry & Physiology. 79A (4): 651-654. https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90464-X

Silanikove, N. 1996. Feed utilization. energy. energy and nitrogen balance in desert black Bedouin goats. World Review of Animal Production. 22 (1995): 93-96. https://www.researchgate.net/publication/236162591_Feed_utilization_energy_and_nitrogen_balance_in_the_desert_black_Bedouin_goat

Silanikove, N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. Small Ruminant Research. 35 (2000): 181-193. https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00096-6

Sinclair, K.D., Sinclair, L.A. and Robinson, J.J. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: 1. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. Journal of Animal Science. 78 (10): 2659-2669. https://doi.org/10.2527/2000.78102659x

Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H. and Abdalla1, A.L. 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. Journal of Animal and Feed Sciences. 21 (4):759-772. https://doi.org/10.22358/jafs/66148/2012

Strauss, R.E. 1979. Reliability estimates for Ivlev index. the forage ratio. and a proposed linear index of food selection. Transactions of American Fisheries Society. 108 (4):344-352. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1979)108<344:REFIEI>2.0.CO;2

Stuth, J.W. 1991. Foraging behavior. Pp. 65-83. In: Stuth J.W., editor. Grazing Management: An Ecological Perspective (Heitschmidt R. K., and J. W. Stuth. eds.): Timber Press. Portland Oreg. U. S. A. http://cnrit.tamu.edu/rlem/textbook/textbook-fr.html

IBM Corp. Released. 2011. IBM SPSS Statistics for Windows. Version 20.0. Armonk. NY: IBM Corp.

Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B. and Barry, T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants. protein concentrate meals and cereal grains. Journal of the Science of Food and Agriculture. 58 (3): 321-329. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580306

Wiggins, I.L. 1980. Flora of Baja California. Stanford. University Press, CA, EUA.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Utilization of coffee silverskin aqueous extract to improve pork meat homogenates oxidative stability

Utilización del extracto acuoso de cascarilla de café para mejorar la estabilidad oxidativa de homogenizados de carne de cerdo

Rey David Vargas-Sánchez, Brisa del Mar Torres-Martínez, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia and Armida Sánchez-Escalante* ✉

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA). Laboratorio de Investigación en Carne y Productos Cárnicos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas #46, Hermosillo 83304, Sonora, México.

ABSTRACT

Coffee fruit processing residues have been proposed to prevent meat quality loss. This study aimed to evaluate the effectiveness of coffee silverskin aqueous extract (CSE) on the oxidative stability of a pork meat homogenate. CSE was subjected to polyphenols determination (total phenol, flavonoids, and caffeoylquinic acid contents) and antiradical and reducing power assays. In addition, raw pork meat homogenates were divided into four treatments (CN, control or without antioxidant; T1 and T2, CSE at 250 and 500 ppm, respectively; BHT, synthetic antioxidant at 500 ppm), oxidized for 1 h with potassium ferrocyanide (0, 0.5, and 1.0 %, *w/v*), and subjected to meat quality evaluation (pH, lipid oxidation, color, and metmyoglobin content). Results demonstrated that CSE is an important source of polyphenols with antioxidant activity, and their incorporation in a raw pork meat homogenate led to reduce pH values, lipid oxidation, and metmyoglobin content, as well as decreased color changes ($p < 0.05$). These results suggest that CSE has great potential as an antioxidant additive for meat products.

Keywords: coffee residues; bioactive compounds; antioxidants, meat quality.

RESUMEN

Los residuos del procesamiento del fruto de café se han propuesto como una estrategia para prevenir la pérdida de calidad de la carne. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la efectividad del extracto acuoso de cascarilla de café (CSE) sobre la estabilidad oxidativa en un sistema de homogenizados de carne cruda de cerdo. El CSE se sometió a la determinación de polifenoles (fenoles, flavonoides y ácido cafeoilquínico), así como a ensayos de actividad antirradical y poder reductor. Además, los homogenizados de carne cruda de cerdo se dividieron en cuatro tratamientos (CN, control o sin antioxidante; T1 y T2, CSE a 250 y 500 ppm, respectivamente; BHT, antioxidante sintético a 500 ppm), oxidados por 1 h con ferrocianuro de potasio (0, 0.5 y 1.0 %, *p/v*), y fueron sometidos a evaluación de calidad de la carne (pH, oxidación de lípidos, color y contenido de metamioglobina). Los resultados demostraron que los CSE son una fuente importante de polifenoles con actividad antioxidante, y su incorporación en un homogenizado de carne de cerdo cruda condujo a una reducción de los valores de pH, oxidación de lípidos y contenido de metamioglobina, así como a una disminución de los cambios de color ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el CSE tiene un gran potencial como aditivo antioxidante para productos cárnicos.

Palabras clave: residuos del café; compuestos bioactivos; antioxidantes; calidad de la carne.

INTRODUCTION

In Mexico, pork production was around 1.5 metric tons (Mt), with a *per capita* consumption of 20.8 kg in 2021 and a total domestic consumption of 2.5 Mt. Furthermore, Mexico imports approximately 1.2 Mt, mainly from the USA market, and exports approximately 0.3 Mt to the Asiatic market, including China and Japan. This country's leading pork producing states were Jalisco, Sonora, and Puebla, with a participation of 22.6, 18, and 10.8%, respectively, concerning the total production (USDA, 2023). According to Mexican regulations, different products can be obtained from meat processing, such as cured, aged, dried, raw/cooked ready, or not for consumption (NOM, 2018).

Moreover, regardless of the type of pork meat products, lipid-protein oxidation is considered a primary degradation of quality loss in these products. Oxidative deterioration induced by intrinsic factors, including a high concentration of unsaturated and polyunsaturated lipids, heme pigments, and oxidizing agents among others, can result in nutrient losses, organoleptically undesirable changes, formation of toxic compounds, and consequently, loss of acceptability by consumers (Hadidi *et al*., 2022). In this regard, antioxidant agents are incorporated into different meat products to enhance oxidative stability; however, synthetic antioxidants have been associated with adverse effects on human health. Although these agents are widely used due to low cost, effectiveness and stability, natural antioxidants from plant by-products are considered a significant option to reduce partial or complete uses (Ribeiro *et al*., 2019; Hadidi *et al*., 2022).

In this context, coffee is one of the most consumed

*Author for correspondence: Armida Sánchez-Escalante
e-mail: armida-sanchez@ciad.mx
Received: August 14, 2023
Accepted: November 23, 2023
Published: December 6, 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2128

beverages in the world, and to obtain it, its fruit must be subjected to a process of pulping, fermenting, washing, drying, and roasting, which generates many residues as by-products and waste at each stage (Klingel *et al*., 2020; Serna *et al*., 2022). Coffee silverskin (CSS), the major coffee-roasting residue, is an important source of dietary fiber and bioactive compounds, including caffeine, melanoidins, and phenolic compounds. Therefore, it has been incorporated as an ingredient in the formulation of bakery products to improve nutritional, physicochemical, and sensory attributes (Klingel *et al*., 2020).

In a previous investigation, the effects of CSS powder as a natural ingredient in chicken meat patties were evaluated. It was concluded that the inclusion of this natural antioxidant reduced the formation of oxidative products, thereby influencing the sensory attributes. Consequently, they suggested further research into its application in novel meat formulations (Martucelli *et al*., 2021a). Based on the above, the use of CSS as an antioxidant ingredient for improving the oxidative stability of meat products is still limited.

Therefore, this investigation aimed to evaluate the effectiveness of coffee silverskin aqueous extract on the oxidative stability of a pork meat homogenate.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used were of analytical grade. Folin-Ciocalteu, sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium hydroxide (NaOH), sodium nitrite ($NaNO_2$), sodium phosphate monobasic and dibasic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ and Na_2HPO_4, respectively), potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), ethanol (HPLC), butylated hydroxytoluene (BHT), gallic acid, quercetin, chlorogenic acid, iron(III) chloride 6-hydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), iron(II) sulfate 7-hydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), aluminum chloride ($AlCl_3$), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), hydrochloric acid (HCl), glacial acetic acid (CH_3COOH), urea (CH_4N_2O) and potassium ferrocyanide ($[Fe(CN)_6]^{4-}$), were purchased from Sigma Chemicals. While 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA) and tetramethoxypropane (TMP), were acquired from J.T. Baker®.

Coffee residues processing

A commercial supplier (CAFFENIO®, Hermosillo, Sonora, México) donated coffee silverskin flakes from dark *Coffea arabica* L. Coffee silverskin flakes were pulverized to a particle size of 20 mesh (Pulvex 200, CDMX., Mexico). The obtained material was packed under vacuum (Food Saver®, FLA., USA), sterilized at 121 °C for 20 min (Yamato SM300, TYO. Japan), and stored at room temperature (25 °C) until further use.

Coffee residues processing

Bioactive compounds from coffee silverskin were extracted with water (1:10 ratio) by maceration-assisted extraction at 150 rpm (24 °C) for 48 h, in the dark (Fisher Scientific MaxQ-5000, NEP, Canada). The resultant mixture was filtered (Whatman no. 1 filter paper), concentrated under reduced pressure at 60 °C in a rotary evaporator (RE301BW, Yamato, TYO., Japan), and lyophilized in a freeze dryer (DC401, Yamato, TYO., Japan). The coffee silverskin aqueous extract (CSE) obtained was stored in the dark at -20 °C until analysis.

Polyphenols content of CSE

Total phenolic content (TPC)

TPC was measured by the Folin-Ciocalteu method (Matić and Jakobek, 2021) with slight modifications. Briefly, 20 µL of CSE (5 mg/mL) were mixed with 160 µL of distilled water, 40 µL of Folin-Ciocalteu's reagent (2 M), and 60 µL of Na_2CO_3 solution (7 %, *w/v*). The resultant mixture was incubated at 25 °C for 1 h under dark conditions. The absorbance was measured at 750 nm in a spectrophotometer (Multiskan FC UV-Vis, Thermo Scientific, TYO., Japan), and results were expressed as mg of gallic acid equivalent/g of dried extract (mg GAE/g).

Total flavonoids content (TFC)

TFC was measured by the aluminum chloride-complex formation method (Matić and Jakobek, 2021) with slight modifications. Briefly, 20 µL of CSE (5 mg/mL) were homogenized with 130 µL of methanol and 20 µL of $AlCl_3$ (5 %, *w/v*). The resultant mixture was incubated 30 min at 25 °C under dark conditions. The absorbance was measured at 415 nm, and results were expressed as mg of quercetin equivalents/g (mg QE/g).

Caffeoylquinic acid content (CAC)

CAC was evaluated according to Griffiths *et al*. (1992) with slight modifications. Briefly, 100 µL of CSE (5 mg/mL) were mixed with 200 µL of urea (0.17 M), 200 µL of glacial acetic acid (0.1 M), and 500 µL of distilled water. The resultant mixture was homogenized with 500 µL of $NaNO_2$ (0.14 M) and 500 µL of NaOH (1 M), centrifuged at 2250× g for 10 min at 4 °C (Sorvall ST18R, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The absorbance was measured at 510 nm, and results were expressed as mg chlorogenic acid equivalents/g (mg CGA/g).

Antiradical activity of CSE

Free radical scavenging activity

This activity was measured by the DPPH method (Ozgen *et al*., 2006) with slight modifications. Briefly, 100 µL of CSE (5 mg/mL) were mixed with 100 µL of DPPH ethanol solution (300 µM). The resultant mixture was incubated at 25 °C for 30 min under dark conditions. BHT (0.1 mg/mL) was used as positive control. The absorbance was measured at 517 nm, and the results were expressed as a percentage of inhibition: [(Radical absorbance at 0 min) – (Radical absorbance + antioxidant at 30 min) / (Radical absorbance at 0 min)] x 100.

Radical cation scavenging activity

This activity was determined by the ABTS method (Ozgen *et al*., 2006) with slight modifications. Briefly, 20 µL of CSE (5 mg/mL) were mixed with 180 µL of ABTS solution (abs 0.7

at 730 nm). The resultant mixture was incubated at 25 °C for 8 min under dark conditions. BHT (0.1 mg/mL) was used as positive control. The absorbance was measured at 730 nm, and the results were expressed as a percentage of inhibition: [(Radical absorbance at 0 min) – (Radical absorbance + antioxidant at 30 min) / (Radical absorbance at 0 min)] x 100.

Reducing power activity of the aqueous extract
Reducing power activity
This activity was determined by the ferricyanide/Prussian blue method (Berker *et al*., 2010) with slight modifications. Briefly, 200 µL of CSE (5 mg/mL) were mixed with 300 µL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500 µL of potassium ferrocyanide (1%, *w/v*) and incubated at 50 °C for 20 min, under dark conditions. The resultant mixture was homogenized with 500 µL of TCA (10%, *w/v*) and centrifuged at 2300× g at 4 °C for 10 min. Subsequently, 100 µL of the supernatant were homogenized with 100 µL of $FeCl_3$ (0.1%, *w/v*). BHT (0.1 mg/mL) was used as positive control. The absorbance was measured at 700 nm, and the results were expressed as absorbance at the same wavelength.

Ferric reducing/antioxidant power
This activity was determined by the FRAP method (Berker *et al*., 2010) with slight modifications. Briefly, 20 µL of CSE (5 mg/mL) were homogenized with 180 µL of FRAP solution [10:1:1, 300 mM buffer sodium acetate in glacial acetic acid at pH 3.6 and TPTZ (10 mM) in HCl (40 nM) and $FeCl_3$ (20 mM)]. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 8 min under dark conditions. BHT (0.1 mg/mL) was used as positive control. The absorbance was measured at 595 nm, and the results were expressed as mg of Fe^{2+} equivalent/g (mg Fe^{2+}/g).

Meat homogenates preparation
Fresh pork meat (*Semimembranosus* muscle, at 48 h *post-mortem*) was purchased from a local processor (Norson®, Hermosillo, Mexico). Any visible extra-muscular fat was trimmed, and then the meat minced using a 4.5 mm-hole plate (meat grinder 4152, 4 Hobart Dayton, OH, USA). The minced pork meat was mixed with salt (1.5 %, *w/w*) and pork back fat (10 % in the final formulation, *w/w*). Subsequently, the obtained minced meat (1 g) was homogenized with 10 mL of distilled water at 6000 rpm at 5 °C for 1 min (Ultraturrax T25, IKA, Germany), and 100 µL of the respective antioxidants: CN, without antioxidants; T1 and T2, CSE at 250 and 500 ppm, respectively; BHT, synthetic antioxidant at 500 ppm. The mixture was oxidized with 50 µL potassium ferrocyanide at 0, 0.5, and 1.0 % (*w/v*). After that, meat homogenates were stored at 4 °C for 1 h and subjected to oxidative stability evaluation.

Oxidative stability of meat homogenates
pH values
The pH values of meat homogenates were determined using a potentiometer with automatic temperature control (pH211, Hanna Instruments Inc., RI, USA) following the procedure 981.12 (AOAC, 2020).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)
Lipid oxidation of meat homogenates was determined by the TBARS method (Pfalzgraf *et al*., 1995). Meat homogenates (10 g) were homogenized with 20 mL of TCA (10%, *w/v*) (4500 rpm at 5 °C for 1 min) and centrifuged (2500× g at 5 °C for 20 min). Subsequently, 2 mL of the filtered supernatant were mixed with 2 mL of TBA solution (20 mM) and incubated at 98 °C for 20 min. After that, the absorbance was measured at 531 nm. The results were expressed as mg of malondialdehyde/kg of pork meat (mg MDA/kg).

Color parameters values
The color parameters values of meat homogenates were evaluated as described previously (Sánchez *et al*., 2001). The color parameters were performed using a spectrophotometer (CM 508d, Konica Minolta Inc., TYO, Japan) with a D65 illuminant and a 10° observer calibrated with a white calibration cap (CM-A70). Color parameters consisted of lightness (L*), redness (a*), yellowness (b*), Chroma (C*), and hue (h*).

Metmyoglobin content (MMb)
MMb of meat homogenates was measured using a spectrophotometer as described previously (Sánchez *et al*., 2001). The maximum value of the quotient K/S525 and K/S572 at the beginning of the experiment (day 0) was fixed as 0 % MMb, while 100 % MMb was obtained after oxidizing the meat sample in potassium ferricyanide (1 %, *w/v*).

Statistical analysis
Data obtained from all measurements were expressed as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent trials. Polyphenols content and antioxidant activity data were subjected to a t-test. In addition, data from meat quality assays were subjected to a two-way analysis of variance, using the treatments (CN, T1, T2, and BHT) and level of oxidized agent (0, 0.5, and 1.0 %) as the fixed effect, including the interaction. A Tukey-Kramer test was conducted for means comparison ($p < 0.05$). Also, a principal components analysis was performed to determine the relationship between the analyzed parameters and treatments (SPSS, version 21).

RESULTS AND DISCUSSION

Polyphenols content of CSE

Table 1 reports the polyphenols content results of CSE. The results showed the presence of phenolic, flavonoids, caffeoylquinic acid, in this extract.

According to the literature, coffee silverskin is an important source of antioxidant components like alkaloids (caffeine), vitamins (tocopherols *α*, *β*, *γ*, and *δ*), phenolic components (chlorogenic acid and their derivates, including 5-*O*-, 3-*O*- and 4-*O*-caffeoylquinic acids), and carbohydrates associated with polysaccharides (Bessada *et al*., 2018). In agreement with our study, it has been demonstrated that CSE obtained by maceration-assisted extraction is a source of polyphenols, including phenolics, flavonoids, and caffeoylquinic acid; however, the results of the cited study were

Table 1. Polyphenols content and antioxidant activity of CSE.
Tabla 1. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante del CSE.

Item	Results
Polyphenols	
TPC (mg GAE/g)	103.16 ± 3.48
TFC (mg QE/g)	43.62 ± 1.86
CAC (mg CGA/g)	23.19 ± 0.35
Free radical scavenging activity (% inhibition)	
CSE	42.76 ± 4.02
BHT	56.84 ± 3.90
p-value	< 0.001
Radical cation scavenging activity (% inhibition)	
CSE	12.82 ± 1.07
BHT	47.12 ± 2.61
p-value	< 0.001
Reducing power ability (Abs 700 nm)	
CSE	0.43 ± 0.01
BHT	1.47 ± 0.04
p-value	< 0.001
Ferric reducing antioxidant power (mg Fe^{2+}/g)	
CSE	1.23 ± 0.18
BHT	1.39 ± 0.09
p-value	< 0.001

Values expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. CSE, coffee silverskin aqueous extract; BHT, butylated hydroxytoluene; TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content; CAC, caffeoylquinic acid content.
Valores expresados como media ± DE de al menos tres experimentos independientes. CSE, extracto acuoso de piel plateada de café; BHT, butilhidroxitolueno; TPC, contenido total de fenoles totales; TFC, contenido total de flavonoides; CAC, contenido de ácido cafeoilquínico.

greater than those obtained in our study, which is associated with the extraction method used, i.e., ultrasound-assisted extraction (Rodrigues *et al*., 2015; Vimercati *et al*., 2022; Vargas *et al*., 2023). In contrast with our study, lower TPC and CAC values (approx. 5 mg GAE/g and 0.4 mg CGA/g, respectively) were reported in the extract obtained from coffee silverskin (Martuscelli *et al*., 2021b).

Antioxidant activity of CSE

Table 1 also reports the antioxidant activity results of CSE. The results showed that the synthetic antioxidant (BHT) showed 35 % greater ($p < 0.05$) free radical scavenging activity compared to CSE. Although both antioxidants showed values greater than 40 % of inhibition. In addition, BHT showed 72.8 % greater radical cation scavenging activity compared to CSE ($p < 0.05$). Regarding reducing power activity, BHT showed FRAP values 11.5 % greater ($p < 0.05$) than CSE, both antioxidants report values greater than 1.0 mg Fe^{2+}/g. Also, BHT showed 70.7 % greater ($p < 0.05$) reducing power ability than CSE.

In agreement with our study, it has been evidenced that CSE exerts *in vitro* free radical and radical cation scavenging activity, as well as reducing power activity; however, the results of the cited work were greater than those obtained in our investigation, which is associated with the extraction method used, i.e., ultrasound-assisted extraction (Rodrigues *et al*., 2015; Vimercati *et al*., 2022; Vargas *et al*., 2023). The hydrogen atom transfer (HAT) is the principal mechanism through which polyphenols exert their antioxidant activity, and according to a theoretical investigation, the capacity of caffeoylquinic acid to transfer hydrogen atoms is higher when compared to the caffeic, rosmarinic, ferulic, sinapic, ellagic, vanillic, syringic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids (Sabiq *et al*., 2016).

Oxidative stability of meat homogenates

pH values

Figure 1 illustrates the results of the treatment and the induced pro-oxidation effect, using potassium ferrocyanide in pH changes of pork meat homogenates, which were incorporated with CSE and BHT. The results showed an effect of treatment and pro-oxidation interaction ($p < 0.05$) on this parameter. At 0% of oxidizing, BHT samples showed the higher ($p < 0.05$) pH values for meat homogenates (6.01) respect to CN, T1 and T2 whose values ranged between 5.90-5.97. At 1.0 % of the oxidizing agent, T1 and T2 showed lower ($p < 0.05$) pH values than other treatments.

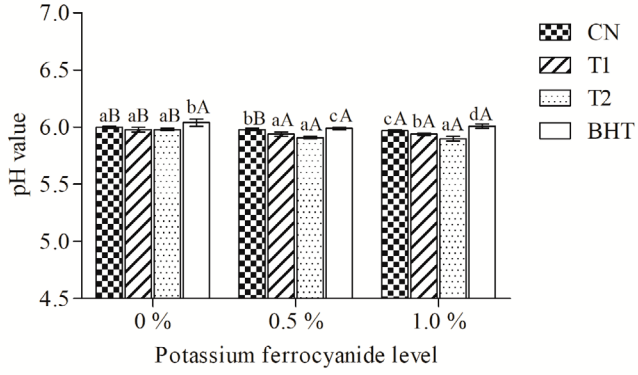


Figure 1. Effect of treatment and pro-oxidation on pork meat homogenates pH values. Lowercase letters indicate significant differences between treatments; capital letters indicate significant differences in each treatment at different pro-oxidation levels ($p < 0.05$).
Figura 1. Efecto del tratamiento y pro-oxidación sobre los valores de pH de homogenizados de carne de cerdo. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos; las letras mayúsculas indican diferencias significativas en cada tratamiento a diferentes niveles de pro-oxidación ($p < 0.05$).

A previous investigation evaluated the influence of the anticaking agent potassium ferrocyanide (80, 2500, and 17500 ppm) on the oxidative stability of frozen minced pork meat, and results showed that pH values were not affected by pro-oxidant incorporation (Hansen *et al*., 1996). In addition, it has been reported that including coffee husk aqueous-ethanol extract (100 and 200 ppm) in raw frozen chicken patties did not affect initial pH values for CN samples (De Farias Marques *et al*., 2022). However, regardless of the antioxidant and pro-oxidant agent addition, in our study, pH values remained within the acceptable range (> 5.5 - 6.1) reported for pork meat (Kim *et al*., 2016a). In agreement with

our study, it has been evidenced that initial pH values of raw and cooked chicken patties were not affected by 1.5 and 3.0 % of coffee silverskin powder addition (Martuscelli *et al*., 2021a). Also, initial pH values of raw and cooked pork patties were not affected by non-compliant green coffee beans extract at 0.15, 0.30, and 0.60 % (Bergamaschi *et al*., 2023).

TBARS values

The incorporation of extracts obtained from agro-industrial residues into meat products is a promissory strategy to improve oxidative stability (Hadidi *et al*., 2022). pH is an intrinsic meat quality parameter involved in lipid oxidation chain reactions (Chaijan, 2008). Oxidative stability decrease has been associated with several oxidant products, including transition metals and salt, which affect their physicochemical properties and promote lipid and protein oxidation (Min *et al*., 2010). In this context, potassium ferrocyanide, a non-physiological iron compound used as an anti-caking agent in salt for human consumption, has also been related to pro-oxidant effects in meat systems (Hansen *et al*., 1996; Van Nguyen *et al*., 2012).

Figure 2 reports the results of the treatment and pro-oxidation effect on lipid oxidation of pork meat homogenates incorporated with CSE and BHT. The results showed an effect of treatment and pro-oxidation interaction ($p < 0.05$) on this parameter. At 0 % of oxidizing, no differences ($p > 0.05$) were found between treatments on TBARS values for meat homogenates; however, these values increased ($p < 0.05$) by the pro-oxidation effect. At 1.0 % of oxidizing agents, T1, T2, and BHT showed the lowest ($p < 0.05$) TBARS values compared to samples from CN.

In a previous study, the influence of potassium ferrocyanide at concentrations of 80, 2500, and 17500 ppm on lipid oxidation in frozen minced pork meat was evaluated. The results indicated that TBARS values remained unaffected at 0 d of storage. However, these values exhibited an increased at 56 d of storage, with a concentration-dependent effect (Hansen *et al*., 1996). In another work, it was evidenced that the incorporation of Fe^{2+} and Fe^{2+} + NaCl increased MDA formation in raw beef patties, 45.1 and 51.2% of inhibition respect CN samples (Min *et al*., 2010). Also, it has been demonstrated that incorporation of potassium ferrocyanide (2.5, 7.5, and 100 ppm) to cod fillets (*Gadus morhua*) accelerated in concentration-dependent lipid oxidation during the salting process, as well as during storage for 6 months (Van Nguyen *et al*., 2012).

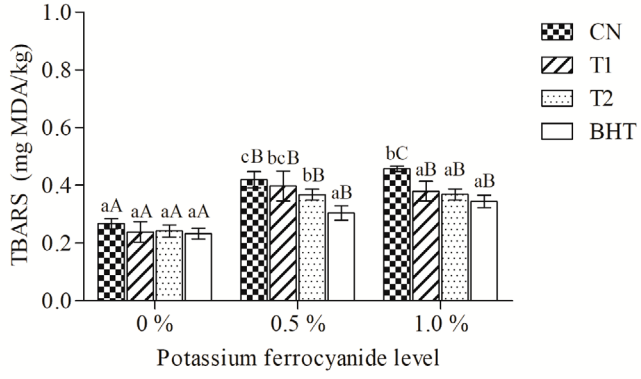


Figure 2. Effect of treatment and pro-oxidation on pork meat homogenates lipid oxidation values. Lowercase letters indicate significant differences between treatments; capital letters indicate significant differences in each treatment at different pro-oxidation levels ($p < 0.05$).

Figura 2. Efecto del tratamiento y pro-oxidación sobre los valores de oxidación de lípidos de homogenizados de carne de cerdo. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos; las letras mayúsculas indican diferencias significativas en cada tratamiento a diferentes niveles de pro-oxidación ($p < 0.05$).

In agreement with our study, the incorporation of spent coffee ground aqueous extract (500 and 1000 ppm) to raw pork meat homogenates reduces MDA formation, approx. 39.5 and 46.9% of inhibition respect to CN, after being subjected to thermal treatment at 37 °C for 12 h (Kim *et al*., 2016b). Also, it has been reported that incorporation of coffee husk aqueous-ethanol extract (100 and 200 ppm) to raw and cooked frozen chicken patties during storage (- 18 °C for 45 d), enhances antioxidant stability through MDA reduction, approx. 90 and 66 % of inhibition, respectively, respect to CN (de Farias Marques *et al*., 2022). In another study, it was demonstrated that incorporation of CSE (500 ppm) into raw pork meat homogenates reduces MDA formation, approx. 55 % of inhibition respect to CN, after being subjected to thermal treatment at 37 °C for 8 h (Vargas *et al*., 2023). Additionally, although the oxidation of meat products can begin from their processing and storage, it has been reported that meat products treated with antioxidants, and whose values did not exceed 0.6 mg MDA/kg, do not present rancid aroma (Georgentelis *et al*., 2007).

Color parameter values

Lipid oxidation is a primary factor that negatively influences meat discoloration, reducing consumer acceptance (Chaijan, 2008). Table 2 reports the results of the treatment and pro-oxidation effect on color parameter values of pork meat homogenates incorporated with CSE and BHT. The results showed an effect of treatment and pro-oxidation interaction ($p < 0.05$) on evaluated color parameters, except for L* values ($p > 0.05$). At 0 % of an oxidizing agent, no differences ($p > 0.05$) were found between treatments on a*, b*, C*, and h* values for meat homogenates. In addition, a*, b*, and C* values decreased by the pro-oxidation effect, while h* values increased ($p < 0.05$). At 1.0 % of the oxidizing agent, T1, T2, and BHT showed higher ($p < 0.05$) a* and C* values respect to CN, which reveals the protective effect of the antioxidants used on color changes of the product. However, non-differences were found in b* values ($p > 0.05$). Furthermore, T1 and T2 showed the lowest ($p < 0.05$) h* values.

In a previous investigation, the influence of potassium ferrocyanide (80, 2500, and 17500 ppm) was determined, on the color of frozen minced pork meat, and results showed that a* values decreased at 0 and 56 d of storage in a concentration-dependent manner (Hansen *et al*., 1996). In addition,

Table 2. Effect of treatment and pro-oxidation on pork meat homogenates color parameter values.
Tabla 2. Efecto del tratamiento y pro-oxidación sobre los valores de los parámetros de color de homogenizados de carne de cerdo.

Item	Treatment	Potassium ferrocyanide level		
		0 %	0.5 %	1.0 %
L* values	CN	39.12 ± 0.39	39.63 ± 0.64	41.12 ± 1.26
	T1	39.84 ± 0.78	39.68 ± 1.29	41.17 ± 0.50
	T2	39.04 ± 0.18	40.96 ± 0.26	40.94 ± 0.09
	BHT	39.26 ± 0.46	41.38 ± 0.76	41.45 ± 1.05
a* values	CN	6.99 ± 0.15 ^{aC}	5.27 ± 0.24 ^{aB}	3.46 ± 0.03 ^{aA}
	T1	7.31 ± 0.26 ^{aB}	5.21 ± 0.16 ^{aA}	4.83 ± 0.34 ^{bA}
	T2	7.35 ± 0.06 ^{aB}	5.32 ± 0.13 ^{aA}	5.57 ± 0.09 ^{bA}
	BHT	6.91 ± 0.10 ^{aB}	5.01 ± 0.13 ^{aA}	4.57 ± 0.36 ^{bA}
b* values	CN	8.76 ± 0.19 ^{aB}	8.66 ± 0.48 ^{aB}	7.34 ± 0.25 ^{aA}
	T1	9.55 ± 0.14 ^{aB}	8.51 ± 0.32 ^{aA}	6.99 ± 0.81 ^{aA}
	T2	9.33 ± 0.10 ^{aB}	8.34 ± 0.23 ^{aA}	7.91 ± 0.09 ^{aA}
	BHT	9.36 ± 0.74 ^{aA}	9.11 ± 0.33 ^{aA}	8.85 ± 0.85 ^{aA}
C* values	CN	11.21 ± 0.13 ^{aC}	10.13 ± 0.53 ^{aB}	8.11 ± 0.24 ^{aA}
	T1	12.03 ± 0.25 ^{aB}	9.98 ± 0.35 ^{aA}	8.50 ± 0.86 ^{abA}
	T2	11.88 ± 0.10 ^{aB}	9.89 ± 0.26 ^{aA}	9.67 ± 0.11 ^{bA}
	BHT	12.30 ± 1.14 ^{aB}	10.40 ± 0.35 ^{aA}	9.96 ± 0.19 ^{bA}
h* values	CN	51.39 ± 1.04 ^{aA}	58.65 ± 0.56 ^{bB}	64.72 ± 0.61 ^{cC}
	T1	52.59 ± 0.75 ^{aA}	55.24 ± 1.20 ^{aB}	58.50 ± 0.62 ^{aC}
	T2	51.72 ± 0.22 ^{aA}	54.83 ± 0.32 ^{aB}	57.44 ± 0.16 ^{aC}
	BHT	53.16 ± 0.59 ^{aA}	61.18 ± 0.42 ^{cB}	62.64 ± 0.57 ^{bC}

Values expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. CN, control; T1, T2, CSE at 250 and 500 ppm, respectively; BHT, butylated hydroxytoluene at 500 ppm. Lowercase letters indicate significant differences between treatments; capital letters indicate significant differences in each treatment at different pro-oxidation levels ($p < 0.05$).
Valores expresados como media ± DE de al menos tres experimentos independientes. CN, control; T1, T2, CSE a 250 y 500 ppm, respectivamente; BHT, butilhidroxitolueno a 500 ppm. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos; las letras mayúsculas indican diferencias significativas en cada tratamiento a diferentes niveles de pro-oxidación ($p < 0.05$).

it has been reported that the incorporation of coffee husk aqueous-ethanol extract (100 and 200 ppm) to raw frozen chicken patties during storage (-18 °C for 45 d) did not affect L* values during the storage period; however, the addition of this extract promotes an increase of a* and b* values (de Farias Marques *et al*., 2022). While the incorporation of potassium ferrocyanide (2.5, 7.5, and 100 ppm) to cod fillets exerts an effect on color parameters (L*, a*, and b*), which was associated with lipid oxidation during the salting process (Van Nguyen *et al*., 2012). In agreement with our study, L*, a*, and b* values of raw and cooked pork patties were not affected by non-compliant green coffee beans extract at 0.15, 0.30, and 0.60 % (Bergamaschi *et al*., 2023). Also, a* value of raw meat balls was not affected by green coffee powder addition at 250 ppm during storage (Mostafa and El Azab, 2022).

MMb values

Lipid and myoglobin oxidation in meat occurs simultaneously, and each process enhances the other. This is because aldehydes affect myoglobin´s redox stability, leading to meat discoloration (Chaijan, 2008). Figure 3 reports the results of the treatment and pro-oxidation effect on the MMb formation of pork meat homogenates incorporated with CSE and BHT. The results showed an effect of treatment and pro-oxidation interaction ($p < 0.05$) on this parameter. At 0 % of oxidizing, T2 showed the lowest ($p < 0.05$) MMb values for meat homogenates. At 1.0 % of the oxidizing agent, T2 showed the lowest ($p < 0.05$) MMb values compared to samples from CN.

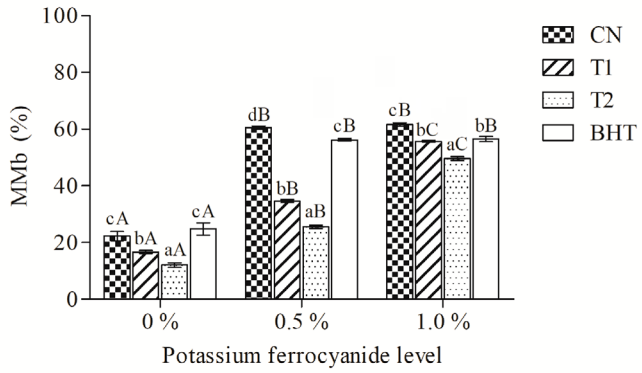


Figure 3. Effect of treatment and pro-oxidation on pork meat homogenates metmyoglobin content. Lowercase letters indicate significant differences between treatments; capital letters indicate significant differences in each treatment at different pro-oxidation levels ($p < 0.05$).
Figura 3. Efecto del tratamiento y pro-oxidación sobre el contenido de metamioglobina de homogenizados de carne de cerdo. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos; las letras mayúsculas indican diferencias significativas en cada tratamiento a diferentes niveles de pro-oxidación ($p < 0.05$).

In a previous study, it has been reported that high concentrations of potassium ferrocyanide result in ferricyanide formation, which improves an immediate oxidative discoloration reaction of pork meat, i.e., $MbO_2 \rightarrow MMb + O_2$ (Hansen *et al*., 1996). In addition, another work demonstrated that the incorporation of Fe^{2+} and Fe^{2+} +NaCl increased MMb formation of beef patties, 68.3 and 68.7% of inhibition respect to CN (Min *et al*., 2010). In agreement with our study, the incorporation of spent coffee grounds to frozen cooked pork patties (0.1 %) reduced MMb values (Jully *et al*., 2016).

Principal components analysis

A principal components analysis was conducted to determine the differences between analyzed parameters and treatments (Figure 4).

The first and second components showed a variance of 56.98 and 38.58 %, respectively; thus, the two components explained an accumulation of 95.56 % of the total variation. The results indicate a significant separation of the analyzed data from antioxidant treatments compared to CN ($p < 0.05$). The above suggests that multivariate analysis is an excellent predictor for oxidative stability of meat quality (Sánchez *et al*., 2001).

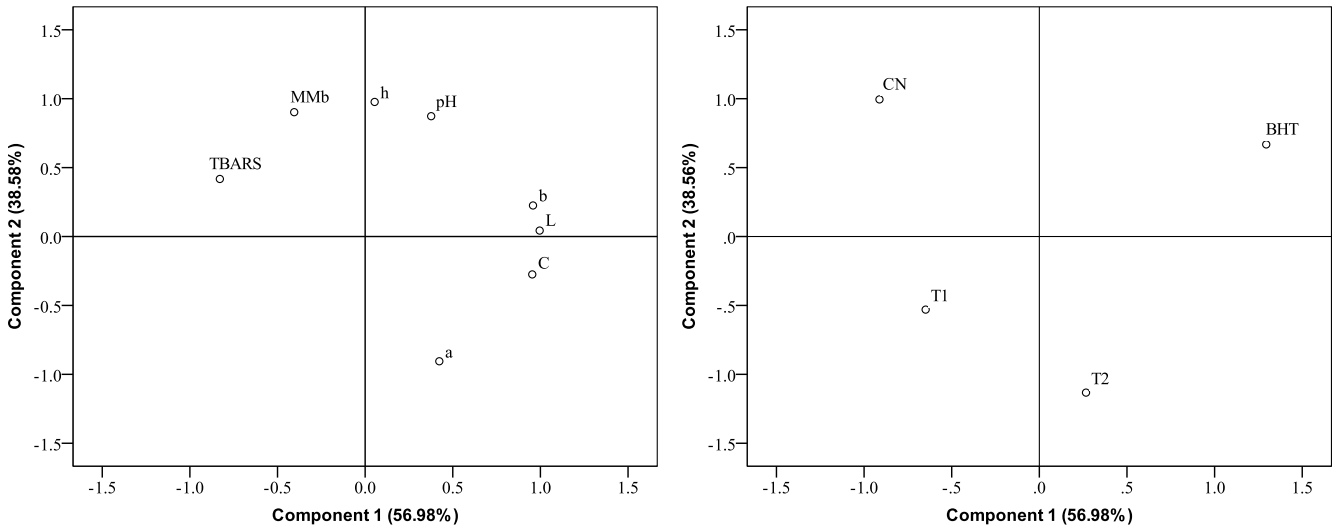


Figure 4. Principal components analysis of evaluated parameters and treatments.
Figura 4. Análisis de componentes principales de los parámetros evaluados y tratamientos.

CONCLUSIONS

In this investigation, the current findings revealed that CSE is an important source of polyphenols, including phenolic components, flavonoids, caffeoylquinic acid, and carbohydrates. In terms of antioxidant activity, this extract exerts antiradical and reducing power activity. Furthermore, incorporating CSE into pork meat homogenates led to reduce pH values, lipid oxidation, and metmyoglobin content, as well as decreased color changes when exposed to an oxidizing agent in comparison to controls. Therefore, our research highlights the significant potential of coffee residues as a valuable source of antioxidant additives for meat industry.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge CONAHCYT for the fellowship of project #739, program "Investigadoras e Investigadores por México". We are grateful to José Antonio Díaz Rangel and Wendy Alejandra Atondo Echeagaray for the technical support of this research.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

AOAC. 2020. AOAC 943.02, pH of flour, potentiometric method. Association of Official Analytical Chemists. [Consulted 23 March 2023]. Available in: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=937

Berker, K.I., Güçlü, K., Demirata, B. and Apak, R. 2010. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the color-forming complexation reagent. Analytical Methods. 2: 1770-1778. https://doi.org/10.1039/C0AY00245C

Bergamaschi, M., Simoncini, N., Spezzano, V.M., Ferri, M. and Tassoni, A. 2023. Antioxidant and sensory properties of raw and cooked pork meat burgers formulated with extract from non-compliant green coffee beans. Foods. 12: 1264. https://doi.org/10.3390/foods12061264

Bessada, S.M.F., Alves, R.C. and Oliveira, M.B.P.P. 2018. Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. Cosmetics. 5: 5. https://doi.org/10.3390/cosmetics5010005

Chaijan, M. 2008. Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. Songklanakarin Journal of Science & Technology. 30: 47-53.

De Farias Marques, A.D.J., de Lima Tavares, J., de Carvalho, L.M., Abreu, T.L., Pereira, D.A., Santos, M.M.F., Madruga, M.S., de Medeiros, L.L. and Bezerra, T.K.A. 2022. Oxidative stability of chicken burgers using organic coffee husk extract. Food Chemistry. 393: 133451. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133451

Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I. and Fletouris, D.J. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. Meat Science. 75: 256-264. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.07.018

Griffiths, D.W., Bain, H. and Dale, M.F.B. 1992. Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. Journal of the Science of Food and Agriculture. 58: 41-48. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580108

Hadidi, M., Orellana-Palacios, J.C., Aghababaei, F., Gonzalez-Serrano, D.J., Moreno, A. and Lorenzo, J.M. 2022. Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. LWT-Food Science and Technology. 169: 114003. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114003

Hansen, T.B., Skibsted, L.H. and Andersen, H.J. 1996. The influence of the anticaking agent potassium ferrocyanide and salt on the oxidative stability of frozen minced pork meat. Meat Science. 43: 135-144. https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)84585-2

Jully, K.M.M., Toto, C.S. and Were, L. 2016. Antioxidant effect of spent, ground, and lyophilized brew from roasted coffee in frozen cooked pork patties. LWT-Food Science and Technology. 66: 244-251. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.046

Kim, T.W., Kim, C.W., Kwon, S.G., Hwang, J.H., Park, D.H., Kang, D.G., Ha, J., Yang, M.R., Kim, S.W. and Kim, I.S. 2016a. pH as analytical indicator for managing pork meat quality. Sains Malaysiana. 45: 1097-1103.

Kim, J.H., Ahn, D.U., Eun, J.B. and Moon, S.H. 2016b. Antioxidant effect of extracts from the coffee residue in raw and cooked meat. Antioxidants. 5(3): 21. https://doi.org/10.3390/antiox5030021

Martuscelli, M., Esposito, L. and Mastrocola, D. 2021a. The role of coffee silver skin against oxidative phenomena in newly formulated chicken meat burgers after cooking. Foods. 10: 1833. https://doi.org/10.3390/foods10081833

Martuscelli, M., Esposito, L., Di Mattia, C.D., Ricci, A. and Mastrocola, D. 2021b. Characterization of coffee silver skin as potential food-safe ingredient. Foods. 10: 1367. https://doi.org/10.3390/foods10061367

Matić, P. and Jakobek, L. 2021. Spectrophotometric Folin-Ciocalteu and aluminum chloride method validation for the determination of phenolic acid, flavan-3-ol, flavonol, and anthocyanin content. Croatian Journal of Food Science and Technology. 13: 176-183. https://doi.org/10.17508/CJFST.2021.13.2.06

Min, B., Cordray, J.C. and Ahn, D.U. 2010. Effect of NaCl, myoglobin, Fe (II), and Fe (III) on lipid oxidation of raw and cooked chicken breast and beef loin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 600-605. https://doi.org/10.1021/jf9029404

Mostafa, H.S. and El Azab, E.F. 2022. Efficacy of green coffee as an antioxidant in beef meatballs compared with ascorbic acid. Food Chemistry: X. 14: 100336. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100336

Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. [Consulted 24 March 2023] 2018. Available in: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5556645&fecha=03/04/2019#gsc.tab=0

Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J.C. and Miller, A.R. 2006. Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 1151-1157. https://doi.org/10.1021/jf051960d

Pfalzgraf, A., Frigg, M. and Steinhart, H. 1995. Alpha-tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. Journal of Agriculture of Food Chemistry. 43: 1339-1342. https://doi.org/10.1021/jf00053a039

Ribeiro, J.S., Santos, M.J.M.C., Silva, L.K.R., Pereira, L.C.L., Santos, I.A., da Silva Lannes, S.C. and da Silva, M.V. 2019. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. Meat Science. 148: 181-188. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.016

Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., das Neves, J., Sarmento, B., Amaral, M.H. and Oliveira, M.B.P. 2015. Coffee silverskin: A possible valuable cosmetic ingredient. Pharmaceutical Biology. 53: 386-394. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.922589

Saqib, M., Iqbal, S., Mahmood, A. and Akram, R. 2016. Theoretical investigation for exploring the antioxidant potential of chlorogenic acid: a density functional theory study. International Journal of Food Properties. 19: 745-751. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1042588

Sánchez, A., Djenane, D., Torrescano, G.R., Beltrán, J.A. and Roncalés, P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. Meat Science. 58: 421-429. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00045-6

Serna, J.A., Siles, J.A., de los Ángeles Martín, M. and Chica, A.F. 2022. A Review on the applications of coffee waste derived from primary processing: strategies for revalorization. Processes. 10: 2436. https://doi.org/10.3390/pr10112436

U.S. Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade. [Consulted 24 March 2023] 2023. Available in: http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf

Van Nguyen, M., Thorarinsdottir, K., Thorkelsson, G., Gudmundsdottir, A. and Arason, S. 2012. Influences of potassium ferrocyanide on lipid oxidation of salted cod (*Gadus morhua*) during processing, storage and rehydration. Food Chemistry. 131: 1322-1331. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.126

Vargas, R.D., Torres-Martínez, B.M., Torrescano, G.R., and Sánchez, A. 2023. Physicochemical, techno-functional and antioxidant characterization of coffee silverskin. Biotecnia. 25: 43-50. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1755

Vimercati, W.C., da Silva Araújo, C., Macedo, L.L. and Pimenta, C.J. 2022. Optimal extraction condition for the recovery of bioactive compounds and antioxidants from coffee silverskin. Journal of Food Process Engineering. 45: e14009. https://doi.org/10.1111/jfpe.14009

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Spatial correlation of dengue with socioeconomic status and land temperature in northwest Mexico

Correlación espacial de dengue con estado socioeconómico y temperatura terrestre en el noroeste de México

Gerardo Álvarez-Hernández[1]*, Daraisy Yera-Grillo[1], Agustín Robles-Morúa[2], Javier Navarro-Estupiñán[3], Pablo Alejandro Reyes-Castro[4], Angélica Aracely Encinas-Cárdenas[1], Héctor Francisco Duarte-Tagles[1], Maria del Carmen Candia-Plata[1]

[1] Universidad de Sonora, Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Hermosillo, México.
[2] Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente. Ciudad Obregón, México.
[3] Universidad de Sonora, Departamento de Matemáticas. Hermosillo, México.
[4] El Colegio de Sonora, Centro de Estudios en Salud y Sociedad. Hermosillo, México.

ABSTRACT

Objective. To characterize the geographic distribution of dengue and to evaluate the spatial autocorrelation with social and climatic determinants at the census-tract level in two medium sized cities in northwestern Mexico. Methods. In this work we apply spatial analysis ecological tools, such as the Moran's Index and the Local Indicator of Spatial Association (LISA) method, to examine global and local spatial correlation between incidence of dengue, with socioeconomic and climatic factors at the census tract-level. For the analysis of the spatial clustering, the Getis-Ord method was used to find statistically significant hot spots in each city. Results. Overall, a global spatial autocorrelation could not be identified, although local clusters of a high dengue incidence, soil surface temperature ≤ 31 °C and high degree of social marginalization coincide. Discussion. We found that at the census-tract level in urban settings, socially disadvantaged populations showed higher clusters of dengue when compared to areas with better socioeconomic conditions. A similar spatial pattern was observed in the two study sites, when considering public health conditions and its aggregation with physical attributes using spatial analysis techniques, supporting the application of this technique for a better understanding about the dengue distribution in urban areas.

Keywords: Dengue, spatio-temporal analysis, social marginalization, census tract, Mexico.

RESUMEN

Objetivo. Caracterizar la distribución geográfica de dengue confirmado y evaluar su autocorrelación espacial con determinantes sociales y climáticos a nivel de áreas pequeñas, en dos ciudades del noroeste de México. Métodos. En este trabajo se utilizan herramientas de análisis espacial, como el Índice de Moran y el método de Indicadores Locales de Asociación Espacial (LISA), para examinar la correlación espacial, global y local, entre la incidencia de dengue y factores climáticos y socioeconómicos a nivel de área geoestadística básica (AGEB). Para mapear áreas de alto riesgo, se usó el método de agrupamiento espacial de Getis-Ord. Resultados. En general, no identificamos una autocorrelación espacial global, aunque agrupamientos locales de una alta incidencia de dengue, temperatura de la superficie terrestre ≤31 °C y un alto grado de marginación social, coinciden. Discusión. Encontramos que a nivel de áreas pequeñas urbanas, poblaciones con desventaja social agrupan una mayor carga de dengue comparadas con áreas de mejores condiciones socioeconómicas. En los dos sitios de estudio, se encontraron patrones espaciales similares que correlacionaron problemas de salud y características físicas del medio ambiente utilizando os análisis espaciales, lo que soporta la utilidad de su uso sistemático para entender mejor la distribución urbana del dengue.

Palabras clave: Dengue, análisis espaciotemporal, marginación social, área censal, México.

INTRODUCTION

Dengue is a viral infection transmitted from human to human through the bite of the female mosquito *Aedes aegypti* or *Ae. albopictus*, present in more than 100 tropical and subtropical countries (Brady *et al*., 2012). In the last decade there has been a notorious upsurge of the disease burden mainly in Latin America and the Caribbean (Kourí, 2011). In the Americas, an endemic-epidemic pattern has been described with periodic outbreaks every three to five years, with a transition from an epidemic-endemic status to an only endemic one recently (Montoya *et al.*, 2012).

The *Aedes* mosquitoes live in close relationship with humans and grow mainly in urban or suburban areas where breeding places and hosts are easily available (Lega *et al*., 2017). The infection can rapidly spread in a community if there are susceptible people, and if there are high densities of the transmitting mosquitoes, therefore the timely control of the latter is considered one of most important actions of prevention (Bhatt *et al*., 2013). A key factor that has determined its status as a public health problem is its growing geographic dispersion associated with a high morbidity, which creates a heavy economic and health burden in endemic countries. More than half of the world's population are at risk of dengue

*Autor para correspondencia: Gerardo Álvarez-Hernández
e.mail: gerardo.alvarez@unison.mx
Received: October 7, 2023
Accepted: December 5, 2023
Published: December 11, 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2175

infection, with 100 million symptomatic cases reported each year (Brady *et al*., 2012).

The spatial and temporal distribution of cases and outbreaks of dengue are related to the interplay of physical, socioeconomic, and climatic conditions, particularly in urban zones with high population density (Bhatt *et al*., 2013; Zellweger *et al*., 2017). Temperature is a key determinant, since the increase in environmental temperature has been observed to decrease the duration of the extrinsic incubation of dengue virus, and increases the frequency of the mosquitoes' propensity to bite. Additionally, temperatures in the range of 22 to 32°C are associated with a higher risk of dengue and are considered the lower and upper threshold of the dengue risk (Fan *et al*., 2015; Peña-García *et al*., 2017). Likewise, rainfall patterns are also powerful drivers of a high density of mosquitos (Benedum *et al*., 2018).

Several studies (Teurlai *et al*., 2015; Phanitchat *et al*., 2019; Watts *et al*., 2020) have analyzed the spatial variability of the incidence of dengue and its relationship with climatic and socioeconomic variables. Overall, a consistent correlation has been found between high incidence rates of the disease and high values of air temperature, rainfall, and humidity; however, also an inverse relation between socioeconomic status and incidence of dengue has been observed (Ogashawara *et al*., 2019).

The increasing use of new methods and tools for spatial analysis, has contributed to improve the understanding of the geographic distribution of dengue and how it is related to the environment. With this in mind, we aim to describe the intraurban spatial distribution of dengue cases, and to ascertain its potential correlation with socioeconomic and climate determinants at the census-tract level in Hermosillo and Ciudad Obregón, two endemic medium-size cities located in northwest Mexico.

MATERIAL AND METHODS

In this study, an ecological approach using Geographic Information Systems (GIS) clustering techniques, and spatially disaggregated health data, are used to examine the spatial correlation between the incidence of dengue and sociodemographic and climatic determinants in the cities of Hermosillo and Ciudad Obregón, in the Mexican state of Sonora, at the northwest of the country. Both cities accounted for 61 % of incidents of dengue cases in Sonora for the period between 2007-2017. Hermosillo is the largest and most populated urban city in the state, in the year 2020 had an estimated population of 936,263 inhabitants and had 577 urban census tracts, known as Basic Geostatistical Areas (BGA) (Gobierno de México, 2020). Its average annual temperature is 24.9 ºC, ranging from 17.4 - 34.0 ºC (Navarro-Estupiñán *et al*., 2018). Meanwhile, Ciudad Obregón has an estimated population of 436, 484 inhabitants and 254 urban BGA (Gobierno de México, 2020). It has an average annual temperature of 25.1 ºC (17.6 - 33.9ºC). Precipitation depends on the influence of the North American monsoon that generates about 70 % of the rainfall during the July to September period for both cities. In each of the urban areas, since the year 1966 annual pluvial precipitation for Hermosillo is 356 mm and for Ciudad Obregón is 386 mm.

The socioeconomic profile of each BGA, entails small geographical units containing 25-50 urban blocks and averaging 2,500 inhabitants, and was based on the Urban Marginalization Index (UMI) delineated by the National Population Council and Housing, which is widely used in Mexico to categorize socioeconomic status (SES) at aggregate levels (Gobierno de México, 2015). The UMI includes data about familial income, degree of schooling, housing quality, overcrowding, and health care insurance among others; the UMI stratifies the SES of each BGA in five socioeconomic deprivation strata (very low, low, intermediate, high and very high). In both cities, most BGA are concentrated in the strata of intermediate, low, and very low marginalization, for Hermosillo 340 (68 %) and for Ciudad Obregón 156 (73 %) of the BGA correspond to such categories.

All study procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Department of Medicine and Health Sciences, University of Sonora. This research only included secondary data analysis and was therefore considered with no risk to humans.

Data sources

To be considered an official incident, a case of dengue must be confirmed by laboratory techniques such as serology (NS1), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for IgG and IgM antibodies, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), carried out in the Sonora State Laboratory for Public Health (LESP). Each confirmed case was recorded in the Epidemiological Surveillance System for Vector Transmitted Diseases during the period of January 1st, 2007, to December 31st, 2017. Each eligible case was then georeferenced using the addresses registered in such surveillance platform, and linked geographically with its corresponding BGA; all addresses were mapped using Google Earth® including street, number, intersections, and neighborhood and then transferred to a vector file in a GIS. Only cases with a known address were used and this resulted in a loss of 6,343 (6.6 %) confirmed cases that could not be georeferenced.

Climatological data, temporal and spatial analysis of temperature

Pluvial precipitation and temperature data were obtained for both cities from the Mexican National Water Commission and the Mexican Weather Service regional office. We used records from 1966 to 2018 retrieved from the single climate stations located within the city limits. Historically. in both cities 70 % of the precipitation falls during the summer months of July and September. In addition, both cities have experienced an increase in air temperatures in the same period, and an average of about three heat waves per year for Hermosillo and five for Ciudad Obregón (Navarro-Estupiñán *et al*., 2018).

As a result of the limited number of climate stations within the city limits, many cities like our study sites are

unable to create spatial maps of air temperature and rainfall variability. Notwithstanding, the land's surface temperature (LST) has been measured using remote sensing applications through various satellites with different spatial and temporal resolutions (Tsou *et al*., 2017; Yang *et al*., 2017). The satellites measure the radiation coming from the Earth-Ocean-Earth-Atmosphere systems, including the solar radiation reflected and the infrared radiation emitted (Sorek-Hamer *et al*., 2016). This allows the use of LST as a proxy for air temperature values in locations with no climate stations, and provides a global understanding about climatic conditions favorable for dengue outbreaks. Thus, Landsat 5 and Landsat 8 satellites' remote sensing images were used to estimate LST. Three thermal bands at a resolution of 30 m were used with images available approximately every 16 days at 11:00 am local time (Navarro-Estupiñán *et al*., 2020). To calculate LST, Landsat 5 data was used for the 2007-2012 period, and Landsat 8 images for the years 2013-2017. A total of 354 satellite images were downloaded and used to create a map of the historic average of LST spatial distribution for both cities (Figure 1).

Temporal and spatial data analysis

Descriptive statistics were used to compare gender and age group of selected cases, according to SES of their BGA of residency for both cities. Statistical differences were examined through Chi-squared test using the SPSS 23 program; values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant. Given that the population data of each BGA was obtained from the 2010 national population census, and that our dengue incidences were estimated for the 2011-2017 period, we calculated the softened cumulative incidence rate (CIR) of dengue per 10,000 inhabitants, based on the Bayes empirical method with the use of the GeoDa ™ program version 1.14.0, and thus avoiding overestimating the incidence of dengue cases given the heterogeneity of the population size of each BGA.

Statistical and spatial correlations

The global spatial correlation between the dengue CIR and each BGA UMI was evaluated using the Moran I Index, in which a value close to 0 indicates a random pattern, a value of -1 indicates that the data are too dispersed and a value close to 1 indicates that there is a positive spatial correlation. For the local bivariate analysis, the Local Indicators of Spatial Association (LISA) method was used (Celemin, 2009). All the above was conducted using the GeoDa™ program version 1.14.0, where the value of statistical significance was $p \leq 0.05$.

To examine the correlation between dengue CIR, UMI, and LST, we set a temperature threshold lower than 30.6 °C as well as a CIR higher than 90.5 cases per 10,000 inhabitants for Hermosillo. A LST threshold lower than 31.4 °C and CIR higher than 37.6 per 10,000 inhabitants were used for Ciudad Obregón. According to previous studies, a temperature threshold located in the 20th percentile indicates an ideal scenario for the development of *Aedes* mosquitoes (Fan *et al*., 2015; Peña-García *et al*., 2017). Furthermore, for the analysis of the spatial

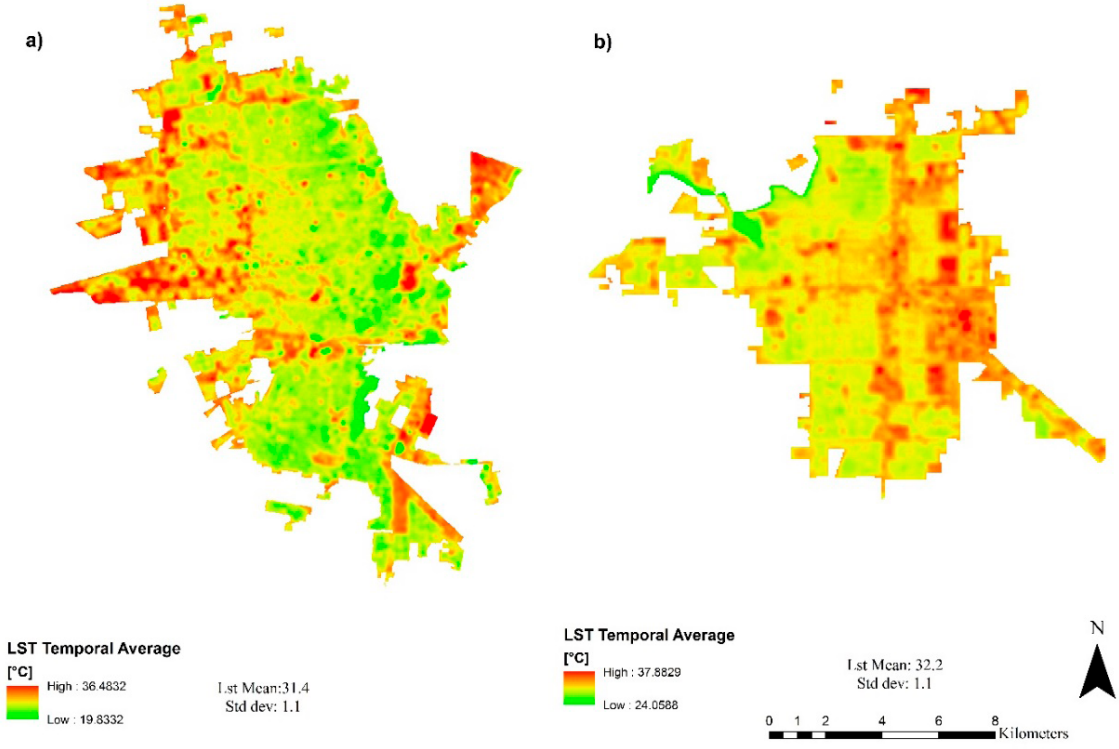


Figure 1. Annual average of LST spatial distributions from 2007-2017 for: (a) Hermosillo and (b) Ciudad Obregón.
Figura 1. Promedio anual de la distribución espacial de la temperatura de la superficie terrestre (LST) del periodo 2007-2017 para: (a) Hermosillo y (b) Ciudad Obregón.

local grouping, the Getis-Ord clustering method was used to find statistically significant "hot and cold" spots within the limits of each city. The Gi* is a Z score, with large range of values, where high scoring implies a more intense clustering (hot spots), and negative values mean cold spots (Peeters *et al*., 2015).

RESULTS

Incidence of dengue

The final study sample comprised 5 921 confirmed dengue cases, 4 924 (83.0 %) corresponded to the city of Hermosillo and 997 (17.0 %) to Ciudad Obregón. No significant differences were observed in the distribution of cases neither by sex nor age strata, although the highest proportion (30.9 %) of cases occurred in subjects aged 30 to 49 years. When dengue cases were stratified by the UMI of each BGA, the highest percentage corresponded to the very low stratum for social marginalization in both cities (Table I). For Hermosillo, 340 BGA accounting for 94 % of the population, showed better welfare but the highest CIR (78.4 per 10 000 inhabitants) of dengue as well. The opposite was observed for Ciudad Obregón, because although 156 BGA accounting for 97 % of its population were classified as less vulnerable, the highest incidence (35.5 per 10,000 inhabitants) corresponded to BGA with a high degree of social marginalization (Table II).

Density of dengue cases per km²

The distribution of cases in Hermosillo was spread-out across the entire city, albeit the largest volume occurred in the north side, ranging between 220 and 273 cases per km². Similarly, in Ciudad Obregón, the dengue cases were distributed throughout the city, but the density per km² showed small areas of concentration, discretely more evident in the central and southern areas of the city, with a density per km² between 77 and 96 cases (Figure 2).

Incidence of dengue cases per 10,000 inhabitants

The highest smoothed CIR found in Hermosillo was 310 per 10 000, while for Ciudad Obregón was considerably lower (62 per 10,000 inhabitants). The higher dengue CIR corresponded to BGA located in the northeast and downtown in Hermosillo (figure 3a), meanwhile for Ciudad Obregón the higher CIR values were dispersedly pinpointed across the city as shown in figure 3b.

Spatial correlations and clustering

When assessing the global spatial autocorrelation in the city of Hermosillo between dengue CIR and the UMI of each BGA, we did not observe a significant value for the Moran's Index (I= -0.040). However, when we used the LISA method, a significant spatial autocorrelation was found in BGA with a high incidence of dengue cases and high degree of social marginalization, particularly in the northern parts of the city. Likewise, in Ciudad Obregón the Moran's I was 0.033, meaning that there is no significant autocorrelation at the global scale. However, the local bivariate analysis showed

Table 1. Sociodemographic characteristics of the study subjects, by site of residency.
Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio, por sitio de residencia.

Variable	N (%)			P#
	Hermosillo	Ciudad Obregón	Total	
Sex				
–Male	2,077 (42.2)	422 (42.3)	2,499 (42.2)	0.932
–Female	2847 (57.8)	575 (57.7)	3,422 (57.8)	
Age group (years)				
<10	331 (6.7)	113 (11.3)	444 (7.5)	0.000*
–10 -19	995 (20.2)	234 (23.4)	1,229 (20.7)	
–20 to 29	995 (20.2)	224 (22.5)	1,219 (20.6)	
–30 to 49	1,559 (31.7)	272 (27.4)	1,831 (30.9)	
–50 to 59	578 (11.7)	83 (8.3)	661 (11.2)	
–60 and over	466 (9.5)	71 (7.1)	537 (9.1)	
BGA degree of social marginalization &				
–Very High	29 (0.6)	2 (0.2)	31 (0.5)	0.246
–High	126 (2.6)	22 (2.2)	148 (2.5)	
–Intermediate	1,199 (24.4)	226 (22.7)	1,425 (24.1)	
–Low	1,614 (32.8)	323 (32.4)	1,937 (32.7)	
–Very Low	1,956 (39.7)	424 (42.5)	2,380 (40.2)	

#Based on a chi square test *Statistically significant at 95 % confidence level.
& Basic Geostatistical Area-level of social marginalization is based on the Urban Marginalization Index from the National Council of Population and Housing.

Table 2. Dengue incidence by degree of social marginalization at the Basic Geostatistical Area-level in the study cities.
Tabla 2. Incidencia de dengue por grado de marginación social a nivel de Área Geoestadística Básica en las ciudades de estudio.

Marginalization stratum	Hermosillo		Ciudad Obregón	
	Incidence*	IQR	Incidence*	IQR
Very High (n = 10)	42.8	26.8-50.4	31.2	30.0-32.2
High (n = 18)	53.2	33.2-68.9	35.5	26.9-44.1
Intermediate (n = 92)	65.9	36.0-85.7	32.6	28.8-37.1
Low (n = 118)	78.4	40.4-93.0	34.6	27.6-38.6
Very Low (n = 209)	62.7	31.2-78.4	31.7	28.5-34.1

*Smoothed cumulative incidence rate per 10 000 habitants.
IQR=Interquartile Range.

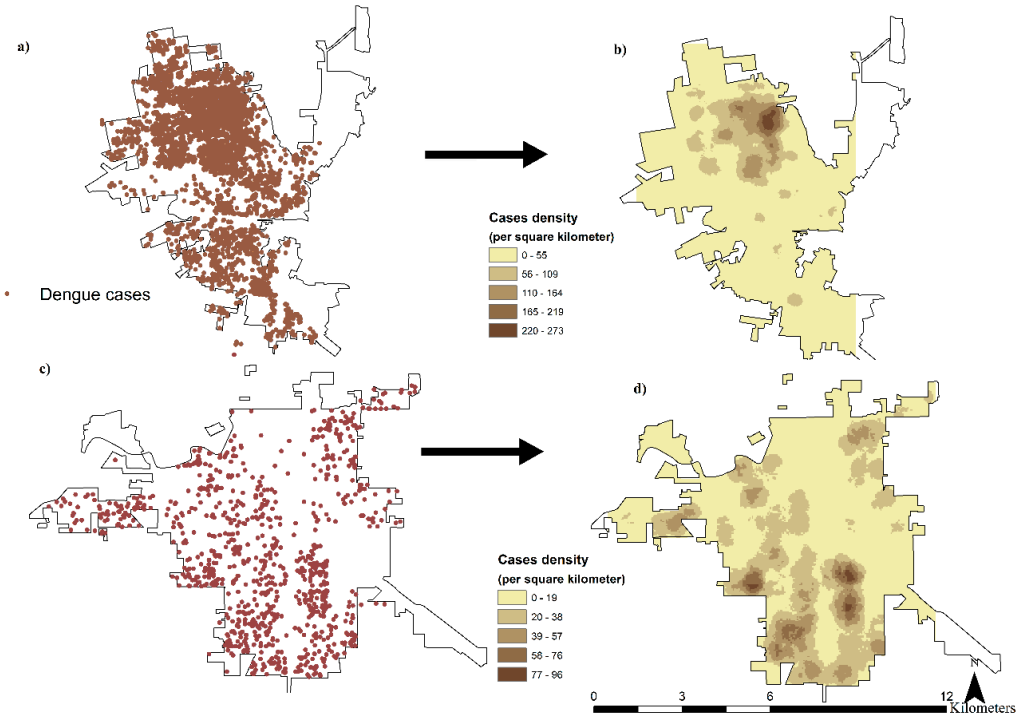


Figure 2. Spatial distribution of the density of dengue cases for (a, b) Hermosillo and (c, d) Ciudad Obregón, Sonora, Mexico.
Figura 2. Distribución espacial de la densidad de casos de dengue para (a, b) Hermosillo y (c, d) Ciudad Obregón, Sonora, México.

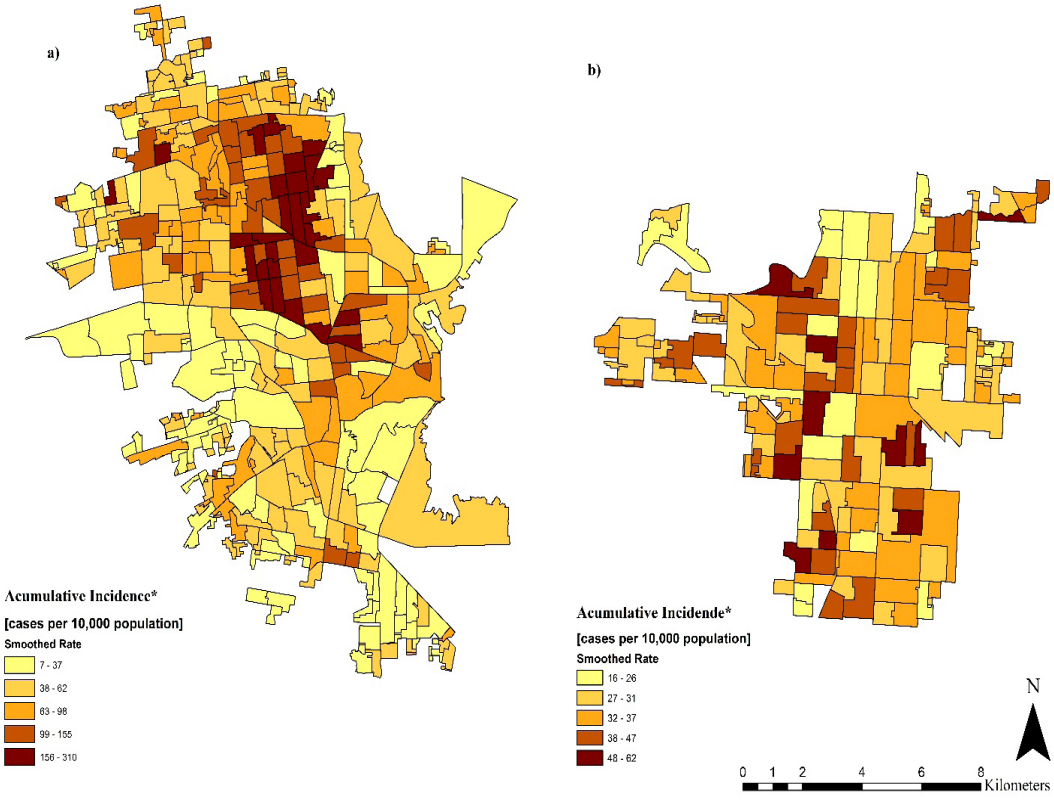


Figure 3. Cumulative incidence rate of dengue at the Basic Geostatistical Area-level for (a) Hermosillo and (b) Ciudad Obregón, Sonora, Mexico.
Figura 3. Incidencia acumulada de dengue a nivel de Área Geoestadística Básica para (a) Hermosillo y (b) Ciudad Obregón, Sonora, México.

three areas with a high incidence and a high UMI (figures 4a and 4b).

Finally, by using the Getis-Ord statistic we found a significant ($p < 0.01$) spatial correlation between the dengue CIR, with the UMI and LST, identifying an area of high risk ("hot spot") clearly defined, and delimited in both cities. For Hermosillo, the hot spots were located at the central and northern side, where we observed a correlation between an incidence of dengue > 90.5 cases per 10,000 inhabitants, an LST below 30.6 °C, and BGA with high degree of social marginalization. Meanwhile, in Ciudad Obregón three hot spots with statistical significance were found, they were located at the northwest, northeast and southwest sectors of the city; in these "hot spots" a high incidence of dengue coincides > 37.6 per 10,000 inhabitants, a temperature of the land surface lower than 31.4 °C and BGA with high social marginalization as shown in figure 5.

DISCUSSION

Overall, our findings in the two dengue endemic cities with the largest population in Sonora, Mexico, indicate that although there is no global spatial correlation between the incidence rate of the disease and contextual socioeconomic conditions, there is a local significant correlation at the census-tract level between occurrence of incident cases of dengue and socioeconomic characteristics of the physical space. It drew attention that BGA with medium, low, and very low social marginalization presented the highest dengue incidence, which is consistent with previous research showing a similar pattern of the disease in urban settings (Fuentes-Vallejo, 2017).

The lack of linear correlation between dengue incidence and socioeconomic conditions of peripheral spaces in both cities, can be explained by the fact that more than 90 % of population resides in BGA considered as medium to very low degree of social marginalization. In spite of that, the LISA analysis showed areas of local clusters in such neighborhoods that coincided with a high incidence of dengue with difficulties connecting to the health network, high poverty rates, and other indicators of social vulnerability, which has also been documented in previous Latin-American studies (Mena *et al*., 2011; do Carmo *et al*., 2020). Thus, a potential ecological fallacy derived from inaccuracies when measuring socioeconomic attributes of the physical space at the census-tract level, may flaw our findings. To overcome this problem, a smaller scale such as blocks of socioeconomic indicators can be approached, or a more specific classification for cities in the north part of the country that have dengue cases but where the social vulnerability categories appear lower when compared to other localities in the south of the country.

Several social determinants of health are consistently

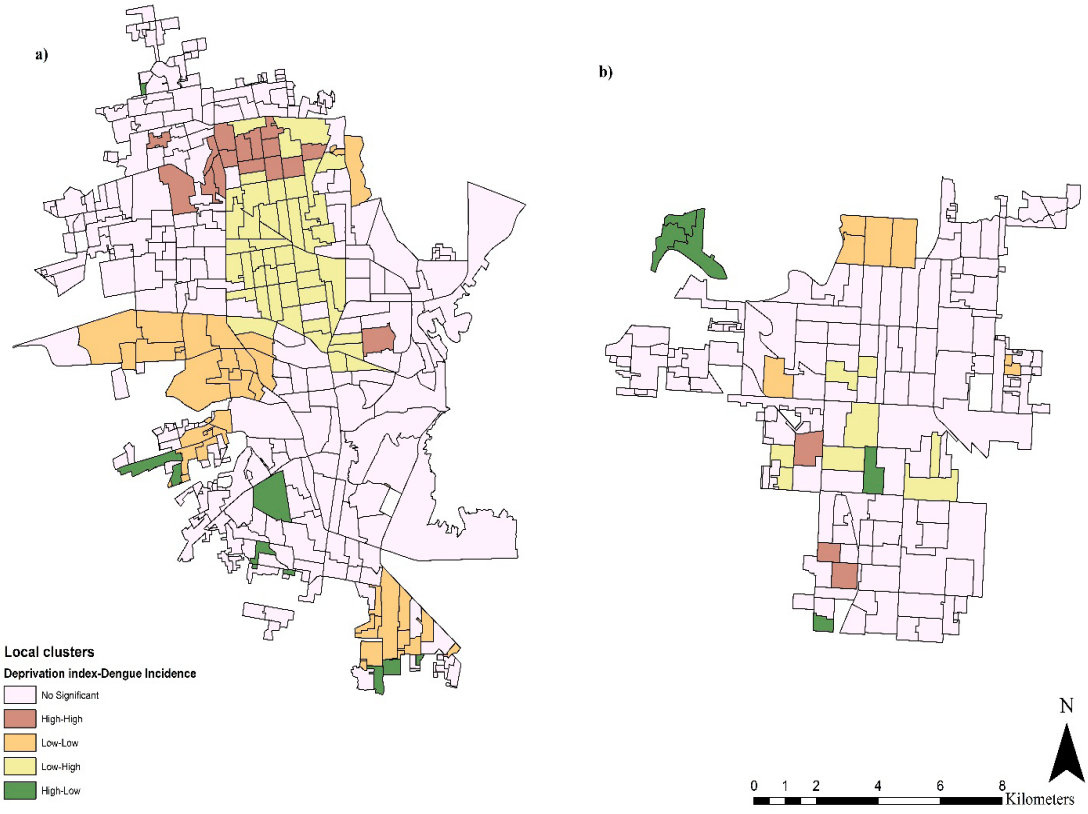


Figure 4. Bivariate local spatial clustering at the Basic Geostatistical Area-level, between incidence of dengue and the index of urban marginalization, for (a) Hermosillo and (b) Ciudad Obregón Sonora, Mexico.
Figura 4. Agrupamientos espaciales locales bivariados a nivel de Área Geoestadística Básica entre la incidencia de dengue y el índice de marginación urbana, para (a) Hermosillo, y (b) Ciudad Obregón, Sonora, México.

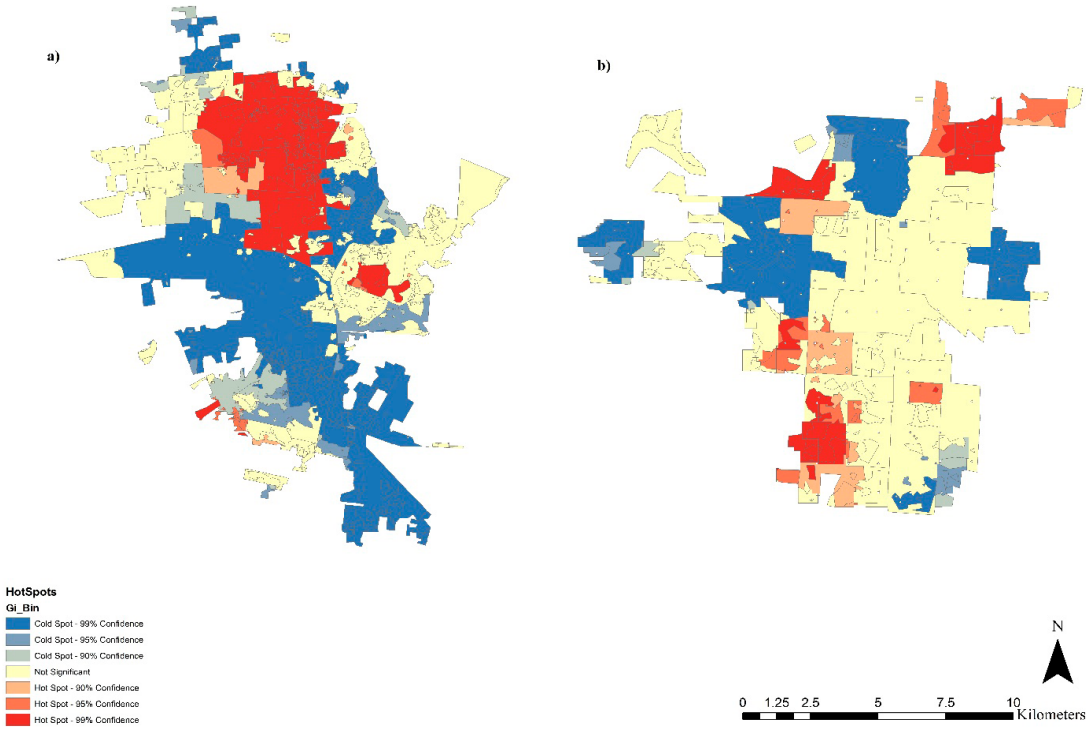


Figure 5. Hot and cold spot areas with 90 %, 95 % and 99 % confidence that combine incidence of dengue, marginalization index and land surface temperature for (a) Hermosillo and (b) Ciudad Obregón, Sonora, Mexico.
Figura 5. Áreas frías y calientes con confianza de 90 %, 95 % y 99 % que combinan la incidencia de dengue, índice de marginación social y temperatura de la superficie terrestre para (a) Hermosillo y (b) Ciudad Obregón, Sonora, México.

related with the incidence of dengue, such as unplanned urbanization, urban slums, overcrowding, and shortage of running water, sewage, and waste management systems, fostering local transmission of the dengue virus in urban scenarios (Kikuti *et al*., 2015; Teurlai *et al*., 2015; Watts *et al*., 2020; Kolimenakis *et al*., 2021). Our results are consistent with previous Mexican studies, as we observed a negative relationship between higher incidence rates of dengue and less social welfare at the aggregate level, indicating that better socioeconomic collective development would mitigate the occurrence of the disease in urban areas with limited resources (Escobar-Mesa y Gómez-Dantés, 2015; Reyes-Castro *et al*., 2017a).

Our results also showed local clusters in BGAs with high dengue incidence rates but low degree of social marginalization, which could be potentially explained by other social variables not included in this study (e.g., population density), as well as climatic conditions of the physical space. In our study, by integrating socioeconomic variables and incidence rates of dengue into a single map, we assess correlations between LST (physical environment) and UMI (social context) finding statistically significant hotspots where a high incidence of the disease coincided with a high surface temperature of the soil, and a high degree of social marginalization. Our findings showed intraurban heterogeneity and overlap with the spatial distribution of infant mortality (Alvarez *et al.*, 2009) and tuberculosis (Alvarez *et al*., 2010) previously examined at the census-tract level in Hermosillo, and are consistent with recent scientific evidence depicting a similar spatial clustering of arboviral diseases in nine cities located in southern Mexico (Dzul-Manzanilla *et al*., 2021). Nonetheless, the incidence heterogeneity of dengue that we observed could be explained by a differential in the mosquito density and its spatial distribution as well. It is accepted that heterogeneity in entomological indices (i.e., Breteau index) are related with differential risk of dengue incidence, with higher dengue cases in areas with higher density of mosquitoes, regardless the implementation of control strategies (Peña-García *et al*., 2016). Entomological data from systematic surveillance should be routinely integrated when assessing spatial distribution of dengue cases.

In addition to contextual social marginalization, individual determinants of welfare such as lower educational level, low family income, among others, contribute to the use of fewer protective barriers (e.g., use of repellants, lack of insecticide pavilions) against the transmitting mosquito. Traditional interventions (e.g., application of larvicides, spatial fumigation) have been found to be less effective in these populations (Reyes-Castro *et al*., 2017b), and may contribute to the weakening of interventions to prevent and control the transmitting mosquito *Aedes* at the neighborhood level. Simultaneous statistical modeling of individual and contextual variables, both biological (i.e., fluctuations in dengue incidence and mosquitoes density) and socioeconomic, such as that used in the multilevel analysis, can help to improve our understanding about the interaction of multiple deter-

minants of the social and physical space on the individual risk of dengue, moreover considering the changes in the variance of dengue cases, within and between groups and over time (Diez-Roux *et al*., 2005; Ordóñez-Sierra *et al*., 2021).

Despite the consistency and reproducibility of findings from different studies to analyze the spatial pattern of dengue as well as other health events, the clustering techniques are mainly based in registered cases, while socioeconomic and climatic variables used in previous studies were analyzed separately. The combination of different techniques from the spatial analysis are urgent in local contexts similar to ours, not only to search for scientific answers but to be implemented for policymakers and health personnel dealing with intraurban growth of *Aedes*-borne diseases. Recognition about the applicability of different spatial analysis tools for dengue risk stratification and the design of interventions to prevent and control of mosquito populations, must be accompanied by substantive improvements in the quality of the secondary data sources used routinely in the national health systems, mainly those for epidemiological reports and entomological monitoring.

In this sense, our research has limitations already pointed out in similar Mexican studies (Dzul-Manzanilla *et al*., 2021; Cortés-Escamilla *et al*., 2022). Our analyses were based in registered confirmed cases, which may flaw identifying additional hotspots in local areas with less access to health care interventions for the timely diagnosis of the disease. We also had limited data to characterize the effect of urban heat islands and their associated dangers, mostly because air temperature data on land depend on the number of climatic stations and these are missing in many cities across the country (Navarro-Estupiñán *et al*., 2020). Because we used a Bayesian approach to calculate the cumulative incidence of dengue at the census-tract level, our estimate may be biased impeding to carry out inferences about population dynamics, so new research needs to consider additional information about the implicit conditions involved in dengue transmission such as geometric projections of population and mosquito density. Other limitation of our study is the use of satellite images, which prevented to accurately measure the moments of mosquito heavier activity throughout the day. Future research on this topic can use historical climate datasets freely available in some internet sites (www.worldclim.org).

CONCLUSIONS

We found that at the census-tract level disadvantaged populations suffer a higher burden of dengue when compared to areas with better socioeconomic conditions. Although in the study sites the disease does not show a global spatial correlation, and there is a heterogeneous pattern throughout both cities, conditions of high social marginalization and a terrestrial temperature below 31 °C were positively correlated with a higher incidence of dengue at the census-tract level.

The use of spatial clustering analysis methods and tools can be useful to characterize the distribution of dengue cases in small areas in endemic localities. Its practicality and low-cost application can help to detect high-risk areas of dengue and thus plan cost-effective strategies aimed to protect vulnerable populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to the Sonora Health Ministry for providing us with the morbidity data used in this study.

CONFLICTS OF INTEREST

All the authors declare they have no conflict of interests.

REFERENCES

Álvarez, G., Lara, F., Harlow, S.D. and Denman, C.A. 2009. Mortalidad infantil y marginación urbana: análisis espacial de su relación en una ciudad de tamaño medio del noroeste mexicano. Rev Panam Salud Pública. 26(1):31-38.

Álvarez-Hernández, G., Lara-Valencia, F., Reyes-Castro, P. and Rascón-Pacheco, R.A. 2010. An analysis of spatial and socioeconomic determinants of tuberculosis in Hermosillo, Sonora. 2000-2006. Int J Tub Lung Dis 14 (6): 708-713.

Benedum, C.M., Seidahmed, O.M.E., Eltahir, E.A.B. and Markuzon, N. 2018. Statistical modeling of the effect of rainfall flushing on dengue transmission in Singapore. PLoS Negl Trop Dis 12 (12):e0006935 https://doi.org/10.1371/pntd.0006935

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. Nature 496: 504-507. https://doi.org/10.1038/nature12060

Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., et al. 2012. Refining the Global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis 6, 1-15 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760

Celemín, J.P. 2009. Autocorrelación espacial e indicadores locales de asociación espacial. Importancia, estructura y aplicación. Rev Univ Geogr 18: 11-31.

Cortés-Escamilla, A., Roche, B., Rodríguez-López, H.M., Lopez-Gatell-Ramírez, H. and Alpuche-Aranda, C. 2022. Spatiotemporal patterns of dengue and zika incidence during the 2015-2018 outbreak of Zika in Mexico. Salud Publica Mex 64: 478-487 https://doi.org/10.21149/13584

do Carmo, R.F., Silva Jr., J.V.J., Pastor, A.F. and Freire-deSouza, C.D. 2020. Spatiotemporal dynamics, risk areas, and social determinants of dengue in northeastern Brazil, 2014-2017: an ecological study. Infect Dis Poverty 9:153 https://doi.org/10.1186/s40249-020-00772-6

Diez-Roux, A.V. and Aiello, A. 2005. Multilevel analysis of infectious diseases. J Infect Dis 191: S25-S33. Doi:10.1086/425288

Dzul-Manzanilla, F., Correa-Morales, F., Che-Mendoza, A., Palacio-Vargas, J., Sánchez-Tejeda, G., González-Roldán, J.F., et al. 2021. Identifying urban hotspots of dengue, chikungunya and Zika transmission in Mexico to support risk stratification efforts: a spatial analysis. Lancet Planet Health 5: e277-e285.

Escobar-Mesa, J. and Gómez-Dantés, H. 2015. Determinantes de la transmisión de dengue en Veracruz: un abordaje ecológico para su control. Salud Publica Mex. 45, 43-53. https://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342003000100006

Fan, J., Wei, W., Bai, Z., Fan, C., Li, S., Liu, Q., et al. 2015. A systematic review and meta-analysis of dengue risk with temperature

change. Int J Environ Res Public Health 12: 1-15. https://doi.org/10.3390/ijerph120100001

Fuentes-Vallejo, M. 2017. Space and space-time distributions of dengue in a hyper-endemic urban space: the case of Girardot, Colombia. BMC Infect Dis 17:512 https://doi.org/10.1186/s12879-017-2610-7

Gobierno de México. 2015. Índice de marginación (carencias poblacionales) por localidad, municipio y entidad. Sonora, 2015. [Internet] México. Consejo Nacional de Población y Vivienda (CONAPO). [Consultado: Octubre 1, 2023] Disponible en:https://datos.gob.mx/busca/dataset/indice-de-marginacion-carencias-poblaciones-por-localidad-municipio-y-entidad

Gobierno de México. 2020. XII Censo Nacional de Población y Vivienda. [Internet] México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Sonora. [Consultado: Septiembre 1, 2023] Disponible en: https://www.inegi.org.mx/app/scitel/Default?ev=10

Kikuti, M., Cunha, G.M., Paploski, I.A.D., Kasper, A.M., Silva, M.O., Tavares, A.S., et al. 2015. Spatial distribution of dengue in a Brazilian urban slum setting: role of socioeconomic gradient in disease risk. PLoS Negl Trop Dis 21 (9):e0003937 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003937

Kolimenakis, A., Heinz, S., Wilson, M.L., Winkler, V., Yakob, L., Michaelikis, A. et al. 2021. The role of urbanisation in the spread of *Aedes* mosquitoes and the diseases they transmit—a systematic review. PLoS Negl Trop Dis 15 (9):e0009631 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009631

Kourí, G. 2011. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. Rev Cuba Salud Publica 37: 616-618. https://doi.org/10.1590/S1020-49892006000300001

Lega, J., Brown, H.E., Barrera, R., Editor, S. and Ritchie, S. 2017. *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae) abundance model improved with relative humidity and precipitation-driven egg hatching. J Med Entomol 54: 1375-1384. https://doi.org/10.1093/jme/tjx077

Mena, N., Troyo, A., Bonilla-Carrión, R. and Rica, C. 2011. Factores asociados con la incidencia de dengue en Costa Rica. Rev Panam Salud Pública 29(4): 234-242.

Montoya, R.H., Diego, J., Zambrano, B., Dayan, G.H. and Dick, O.B. 2012. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg 87: 584-593. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770

Navarro-Estupiñán, J., Robles-Morúa, A., Vivoni, E.R., Zepeda, J., Montoy,a J. and Verduzco, V.V. 2018. Observed trends and future projections of extreme heat events in Sonora, Mexico. Int J Climatol 38 (14): 5158-5181. https://doi.org/10.1002/joc.5719

Navarro-Estupiñan, J., Robles-Morua, A., Díaz-Caravantes, R. and Vivoni, E.R. 2020. Heat risk mapping through spatial analysis of remotely-sensed data and socioeconomic vulnerability in Hermosillo, México. Urban Climate 31, 100576. https://doi.org/10.1016/j.uclim.2019.100576

Ordoñez-Sierra, G., Sarmiento-Senior, D., Jaramillo-Gomez, J.F., Giraldo, P., Porras-Ramírez, A. and Olano, V.A. 2021. Multilevel analysis of social, climatic, and entomological factors that influenced dengue occurrence in three municipalities in Colombia. One Health 12:100234 https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100234

Ogashawara, I., Li, L. and Madriñán, M.J.M. 2019. Spatial-temporal assessment of environmental factors related to dengue outbreaks in São Paulo, Brazil. Geohealth 3 (8): 202-217. https://doi.org/10.1029/2019GH000186

Peña-García, V.H., Triana-Chávez, O., Mejía-Jaramillo, A.M., Díaz, F.J., Gómez-Palacio, A. and Arboleda-Sánchez, S. 2016. Infection rates by dengue virus in mosquitoes and the influence of temperature may be related to different endemicity patterns in three Colombian cities. Int J Environm Res Public Health 13, 7. https://doi.org/10.3390/ijerph13070734

Peña-García, V.H., Triana-Chávez, O. and Arboleda-Sánchez, S. 2017. Estimating effects of temperature on dengue transmission in Colombian cities. Ann Glob Health 83 (4): 509-518. https://doi.org/10.1016/j.aogh.2017.10.011

Peeters, A., Zude, M., Käthner, J., Ünlü, M., Kanber, R., Hetzroni, A. et al. 2015. Getis–Ord's hot- and cold-spot statistics as a basis for multivariate spatial clustering of orchard tree data. Comput Electron Agric 111: 140-150. https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.12.011

Phanitchat, T., Zhao, B., Haque, U., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Aromseree, S., et al. 2019. Spatial and temporal patterns of dengue incidence in northeastern Thailand 2006–2016. BMC Infect Dis 3:1-12. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4379-3

Reyes-Castro, P.A., Harris, R.B., Brown, H.E., Christopherson, G.L., Ernst, K.C. 2017a. Spatio-temporal and neighborhood characteristics of two dengue outbreaks in two arid cities of Mexico. Acta Trop 167: 174-82. http://dx.doi.org/10.1016/jactatropica.2017.01.001

Reyes-Castro, P.A., Luque-Castro, A.L., Díaz-Caravantes, R., Walker, K.R., Hayden, M.H. and Ernst, K.C. 2017b. Outdoor spatial spraying against dengue: a false sense of security among inhabitants of Hermosillo, Mexico. PLoS Negl Trop Dis 11 (5): e0005611 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005611

Sorek-Hamer, M., Just, A.C. and Kloog, I. 2016. Satellite remote sensing in epidemiological studies. Curr Opin Pediatr 28 (2): 228-34 doi:10.1097/MOP.0000000000000326

Teurlai, M., Menkes, C.E., Cavarero, V., Degallier, N., Descloux, E., Grageon, J.P., et al. 2015. Socio-economic and climate factors associated with dengue fever spatial heterogeneity: a worked example in New Caledonia. PLoS Neg Trop Dis 9 (12):e0004211 doi:10.1371/journal.pntd.0004211

Tsou, J., Zhuang, J., Li, Y. and Zhang, Y. 2017. Urban heat island assessment using the Landsat 8 data: a case study in Shenzhen and Hong Kong. Urban Sci 1 (1): 10. https://doi.org/10.3390/urbansci1010010

Watts, M.J., Kotsila, P., Mortyn, P.G., i Monteys, V.S., Brancati, C.U. 2020. Influence of socio-economic, demographic and climate factors on the regional distribution of dengue in the United States and Mexico. Int J Health Geograph 19, 44 https://doi.org/10.1186/s12942-020-00241-1

Yang, C., He, X., Yan, F., Yu, L., Bu, K. and Yang, J. 2017. Mapping the influence of Land use / Land cover changes on the urban heat island effect — a case study of Changchun, China. Sustainability 9 (2): 312. https://doi.org/10.3390/su9020312

Zellweger, R.M, Cano, J., Mangeas, M., Taglioni, F., Mercier, A., Despinoy, M., et al. 2017. Socioeconomic and environmental determinants of dengue transmission in an urban setting: an ecological study in Nauméa, New Caledonia. Plos Negl Trop Dis 11 (4):e0005471 https://doi.org/10.1371/pntd.0005471

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Screening the microbiota of hepatopancreas associated with pirABvp toxin genes in *Penaeus vannamei*

Monitoreo de la microbiota del hepatopáncreas asociada a genes de toxinas pirABvp en *Penaeus vannamei*

Luz Angélica Avila-Villa[2], Gabriel Amílcar Barco-Mendoza[1], Roberto Rodríguez-Ramírez*[1]✉, Jesus Daniel Villanueva-Zayas[1], Marcel Martínez-Porchas[3], Alma Guadalupe Villa-Lerma[1], Belinda Vallejo-Córdoba[3], Josué Delgado-Domínguez[1]

[1] Laboratorio de Biotecnología y Trazabilidad Molecular de los Alimentos. Instituto Tecnológico de Sonora, CP.85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. Tel: +52644-4100900. Fax: +52-644-4109001.
[2] Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, C.P 85010, Cd. Obregón, Sonora, México.
[3] Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), CP. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Shrimp aquaculture has rapidly expanded in the last decades, representing an important economic activity worldwide; however, infections (bacterial and viral) are one of the biggest challenges in aquaculture activity. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) is a bacterial disease that affects shrimp farm ponds and occurs during the first 30 days after stocking in shrimp ponds, causing mortalities of up to 70 - 100 %. Microbiota has an important role in shrimp aquaculture and disease control. In the present study, pirA and pirB genes were amplified by PCR to confirm AHPND and non-AHPND in shrimp hepatopancreas; samples were sequenced using the MiSeq platform targeting the V3-V4 16S ribosomal (rRNA) hypervariable regions. Results demonstrated a diverse microbiota in the non-AHPND group, mainly composed of phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. Furthermore, *Proteobacteria* was the dominant phyla in the hepatopancreas infected with AHPND, while *Firmicutes* tended to decrease. *Vibrio* was the most abundant at the genus level, prevailing in some genera like *Corynebacterium*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Photobacterium*, and *Geobacillus*. Results suggest that AHPND causes dysbiosis in the hepatopancreatic microbiota, and the *Firmicutes* phylum could require to be restored under such scenario.

Keywords: microbiota; PirABvp; AHPND; *Vibrio*; next-generation sequencing; shrimp.

RESUMEN

La producción acuícola de camarón se ha expandido rápidamente en las últimas décadas, convirtiéndose en una importante actividad económica a nivel mundial. Sin embargo, algunas infecciones bacterianas y virales son un gran desafío para esta actividad. La Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) es una enfermedad bacteriana que afecta a los estanques de granjas camaroneras y se presenta durante los primeros 30 días después de la siembra en estanques de camarones, causando una mortalidad del 70 - 100 %. La microbiota tiene un papel importante en la producción del camarón y el control de enfermedades. En el presente estudio, los genes pirA y pirB fueron amplificados por PCR para confirmar tanto organismos positivos como negativos a AHPND en hepatopáncreas de camarones. Posteriormente se secuenciaron las regiones hipervariables ribosómicas (ARNr) V3-V4 del gen 16S utilizando la plataforma MiSeq. Los resultados demostraron una microbiota diversa en el grupo negativo a AHPND, compuesto principalmente por filos *Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria*. Además, *Proteobacteria* fue el filo dominante en el hepatopáncreas infectado con AHPND, mientras que *Firmicutes* tendió a disminuir. Vibrio fue el género más abundante, prevaleciendo sobre algunos géneros como *Corynebacterium, Weissella, Lactobacillus, Photobacterium y Geobacillus*. Los resultados sugieren que la enfermedad de AHPND causa disbiosis en la microbiota hepatopancreática, y el filo *Firmicutes* podría requerir ser restaurado en dicho escenario.

Palabras clave: microbiota; PirABvp; AHPND; *Vibrio*; secuenciación de próxima generación; camarón.

INTRODUCTION

In shrimp, the microbiota plays an important role in the metabolism, besides influencing the control and proliferation of some pathogens (Holt *et al*., 2021; de Paiva Maia *et al*., 2013). The principal changes in shrimp microbiota can be related to factors such as water temperature, pH, salinity, sulfide concentration, and diet components. In aquaculture, some bacteria are used as probiotics due to their ability to modify the microbiota composition of the shrimp intestine, decreasing the proliferation of some pathogenic bacteria such as the *Vibrio* genus (Van Hai and Fotedar, 2010). In this regard, infections caused by *Vibrio* are one of the most recurrent problems faced by commercial fish farms and marine invertebrates (Leyton and Riquelme, 2008).

In 2009, the aquaculture industry experienced the worst disease outbreak ever, caused by unknown pathology, which generated losses of over one billion dollars (FAO, 2013). This pathology was named "early mortality syndrome" (EMS); the

*Author for correspondence: Roberto Rodríguez-Ramírez
e-mail: roberto.rodriguez@itson.edu.mx
Recibido: October 17, 2023
Aceptado: December 08, 2023
Published: December 11, 2023

ponds infected with this pathology present massive shrimp mortalities of up to 70 to 100 %. It appears within 30 to 35 days post-stocking of postlarvae into a newly prepared pond; the gross signs of this disease are characterized by the presence of a crystalline hepatopancreas, stomach, and empty intestine as well as erratic swimming. This disease affects the hepatopancreas, the primary organ responsible for the absorption and storage of food nutrients (Hong *et al*., 2015).

The hepatopancreas is composed of different cell types: E (embryonic), involved in a mitotic activity to produce the other cell types, F (fibrillar), which participates in the secretion of digestive enzymes during feeding, R (absorptive), whose principal function is to absorb diffusible metabolites, and B cells (blister-like) involved in intracellular digestion and assimilation (Wang *et al*., 2014; Vogt, 2019). The progressive degeneration of the B-, R-, E-, and F- cells can be observed by histological tests in shrimp undergoing AHPND (Tran *et al*., 2013; Hong *et al*., 2015). The disease rapidly spread from China to Vietnam in 2010, Malaysia in 2011, Thailand and Mexico in 2013, the Philippines in 2015 (FAO, 2013; Tran *et al*., 2013; Dabu *et al*., 2015), Central America in 2015 (Han *et al*., 2015a), the USA in 2017 (Dhar *et al*., 2019), Korea in 2018 (Han *et al*., 2020), Japan in 2020 and is suspected in others countries in both Asia and Latin America, although not reported (Tang *et al*., 2020).

In 2013, the causal agent of this pathology was identified as a strain of *Vibrio* showing close similarity to *Vibrio parahaemolyticus*. Based on those results, the EMS was renamed Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). These strains can produce a binary toxin called PirABvp, and the genes involved in their production were identified in a ~ 69 Kb pVPA3-1 plasmid detected in *V. parahaemolyticus* strain 13-028/A3 (Yang *et al*., 2014; Han *et al*., 2015). These binary toxins found in AHPND-causing *V. parahaemolyticus* show homology to the PirA and PirB toxins found in Gram-negative enterobacteria *Photorhabdus luminescens*.

The study of this pathology focuses mainly on isolating strains on semi-selective culture media, thus ruling out the intervention of other non-cultivable bacteria and their possible role within this pathology. However, current technologies can generate a large amount of sequence data from a single sample (Weinstock, 2013). Recently, Next Generation Sequencing (NGS) and universal primers have been used for metagenomics analysis of the 16S rRNA gene, which has allowed the identification of bacterial diversities in different samples from clinical, ecological, marine fields, etc. (Salipante *et al*., 2013; Staley *et al*., 2013; Větrovský and Baldrian, 2013). The present study was conducted to analyze the influence of AHPND on the shrimp hepatopancreatic microbiota.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sample collection

The study was conducted on two shrimp farms; farm 1 located at 28°49'22"N, 111°56'27"W, and farm 2 located at 27°9'9.1"N, 110°12'50.3"W, both in Sonora, Mexico; a total of 186 organisms with an average weight of 14 g were analyzed from both farms. The selection criteria were ponds where shrimp presented typical signs of diseases (AHPND). Shrimp were disinfected with 70 % ethanol, dissecting the hepatopancreas in aseptic conditions. Samples were stored in microtubes with 70 % ethanol and transported in freezing conditions to the Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) and stored in a - 20 °C freezer. The water physicochemical parameters at the farms were dissolved oxygen 3 - 6 mg L^{-1}, temperature 25 - 27 °C during the morning and 28 - 32 °C during the afternoon, and pH 8.2 - 8.4. Feeding was based on formulated feed at 22 kg ha^{-1}, without probiotics.

DNA extraction

For genomic DNA (gDNA) extraction, we used shrimp hepatopancreas tissue (50 mg) and followed the method described by Villanueva *et al*. (2021). Briefly, the tissue was mixed with 400 µL of lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8], 25 mM EDTA, and 2 % SDS), 20 µL of proteinase K and heated at 60 °C. Subsequently, 200 µL of NaCl (5.1M) were added, mixed, and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was collected and mixed with 400 µL of chloroform: isoamyl (24:1) and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. After centrifugation, the supernatant was collected to carry out two gDNA pellet washes with 400 µL of cold isopropanol and 70 % ethanol, followed by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. The obtained DNA pellet was dried at room temperature for 10 min. Finally, DNA was dissolved in 50 µL nuclease-free water.

Detection of pirA and pirB genes by PCR

Organisms were confirmed as positive for AHPND by PCR assays based on detecting pirA and pirB genes with AP3 primers (Sirikharin *et al*., 2014). The thermal conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 53 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min, using a Bio-Rad T100 Thermocycler. PCR was performed in a total volume of 25 µL (12.5 µL GoTaq® G2 Hot Start Master Mix [Promega], 9.5 µL nuclease-free water, 1 µL of each primer [10 mM], and 1 µL of gDNA). Afterwards, 10 µL of each PCR product were used to perform electrophoresis in a 1.5 % agarose gel, stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), and imaged using a DnrMinBis Pro (Bio-Imaging System, Jerusalem Israel).

Library preparation and sequencing of the 16S rRNA gene

Library preparation for sequencing of shrimp hepatopancreas microbiota was carried out according to the Illumina 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation Guide (Illumina, 2013). PCR amplification was performed to obtain amplicons with overhang adapters, and a second PCR consisted in adding index sequences to the PCR products. Afterwards, DNA libraries were purified using AMPure beads followed by elutions with 10 mM Tris-HCl pH 8.5.

Subsequently, individual DNA libraries were mixed to obtain pooled DNA libraries, and denaturation was carried out by mixing a 5 µL aliquot of libraries with 5 µL of 0.2 M fresh NaOH. Then, 990 µL of pre-chilled HT1 buffer (Illumina) sere added to obtain a 20 pM library concentration, and a 5 % PhiX-library (Illumina) was added to dilute the library solution to 8 pM. Finally, a sequencing reaction was initiated on the MiSeq instrument (Illumina) using a MiSeq v3 Reagent Tray (Illumina) and 2×300 paired-end reads.

Data analysis

Sequences obtained from Illumina sequencing were processed for quality control using the MG-RAST platform. Sequences of < 200 bp and ambiguous bases were not considered for the analysis. Reads with an average number of 35,000 were assigned to each sample. Taxonomic classification and diversity analysis were performed by comparison against the Ribosomal Database Project using the MG-RAST pipeline. Alpha diversity was estimated by calculating the Shannon index as follows: $H = -\sum[(pi) \times \log(pi)]$, where: H - Shannon diversity index; pi - the proportion of individuals of i-th species in a whole community. pi = n / N, where: n - individuals of a given type/species, and N - total number of individuals in a community.

The correlation of the samples by site in relation to the degree of PirABvp toxin genes detection (AHPD and not AHPND), as well as the grouping of bacteria at the microbiota level, a Principal Component Analysis (PCA) was performed using R Software and a heat map (Cluster) by NCSS 2023 Statistical Software. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software (supplementary material)

RESULTS

From the total number of samples (186) analyzed by PCR, eight were positive to AHPND (four for each farm). Sequencing was performed for the libraries prepared from the positive AHPND samples and two non-AHPND. According to the sequence data, the microbiota in the non-AHNPD group hepatopancreas is composed mainly of phylum *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria*, and *Thermi* in both farms (Fig. 1). Although the non-AHNPD group hepatopancreas of both farms shares the same phyla, the relative abundance for each phylum is different between each farm, finding a higher percentage of *Proteobacteria* and *Actinobacteria* in samples from farm 1 and most abundance of *Firmicutes* in samples from farm 2. Meanwhile, the AHPND group in both farms showed higher bacterial diversity of proteobacteria than those from non-AHPND.

The microbiota in non-AHPND group hepatopancreas at the genus level was composed of *Vibrio* spp. (10.43 - 26.14 %), *Staphylococcus* spp. (1.60 - 17.13 %), *Pseudomonas* spp. (7.55 - 12.86 %), and *Propionibacterium* spp. (1.63 - 5.97 %), with variations on their relative abundance (%) between farms (Figs. 2 - 3). It is worth mentioning that genera *Atopobium* spp., *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium* spp., *Mycobacterium*

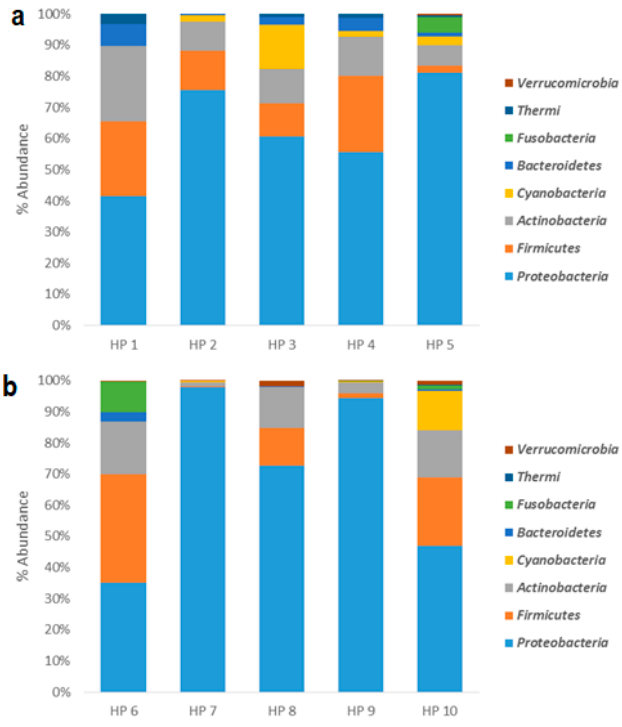


Figure 1. Relative abundance at the phylum level of the microbiota from white shrimp hepatopancreas (*Penaeus vannamei*). a) Farm 1, HP1: non-AHNPD hepatopancreas; HP2, HP3, HP4, HP5: hepatopancreas AHPND, b) Farm 2, HP6: non-AHNPD hepatopancreas; HP7, HP8, HP9, HP10: hepatopancreas AHPND.

Figura 1. Abundancia relativa a nivel de filo de microbiota del hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). a) Granja 1, HP1: hepatopáncreas negativo a AHPND; HP2, HP3, HP4, HP5: hepatopáncreas positivo a AHPND, b) Granja 2, HP6: hepatopáncreas negativo a AHPND; HP7, HP8, HP9, HP10: hepatopáncreas positivo a AHPND.

spp., *Tannerella* spp., and *Parabacteroides* spp. were only found in farm 1 (Fig. 2), and genera *Corynebacterium* spp., *Thermus* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Ochrobactrum* spp., *Leuconostoc* spp., and *Amycolatopsis* spp. were detected only in farm 2 (Fig. 3), in non-AHPND group hepatopancreas. In addition to this, it was observed that the organisms infected with AHPND (AHPND group) had lower bacterial diversity than the non-AHPND group, and the relative abundance of the *Vibrio* genus triggered for both farms (Figures 2 - 3). For the case of farm 1, other genera were more abundant, specifically *Corynebacterium* spp. (8.50 %), *Weissella* spp. (5.86 %), and others (21.4 %) when compared with farm 2. Regarding alpha diversity, the Shannon index revealed a lower diversity in shrimp infected with AHPND (0.96) than in those negative to the pathogen (1.43).

DISCUSSION

In this study, *Proteobacteria* was the phylum with the highest abundance in the non-AHPND and AHPND groups, regardless of the sampled farm (Fig. 1). Remarkably, the higher abundance of *Proteobacteria* in the AHPND group is due to the abundance increased of the genus *Vibrio* spp. (Figs. 2 - 3). Similar studies on shrimp microbiota have shown the pre-

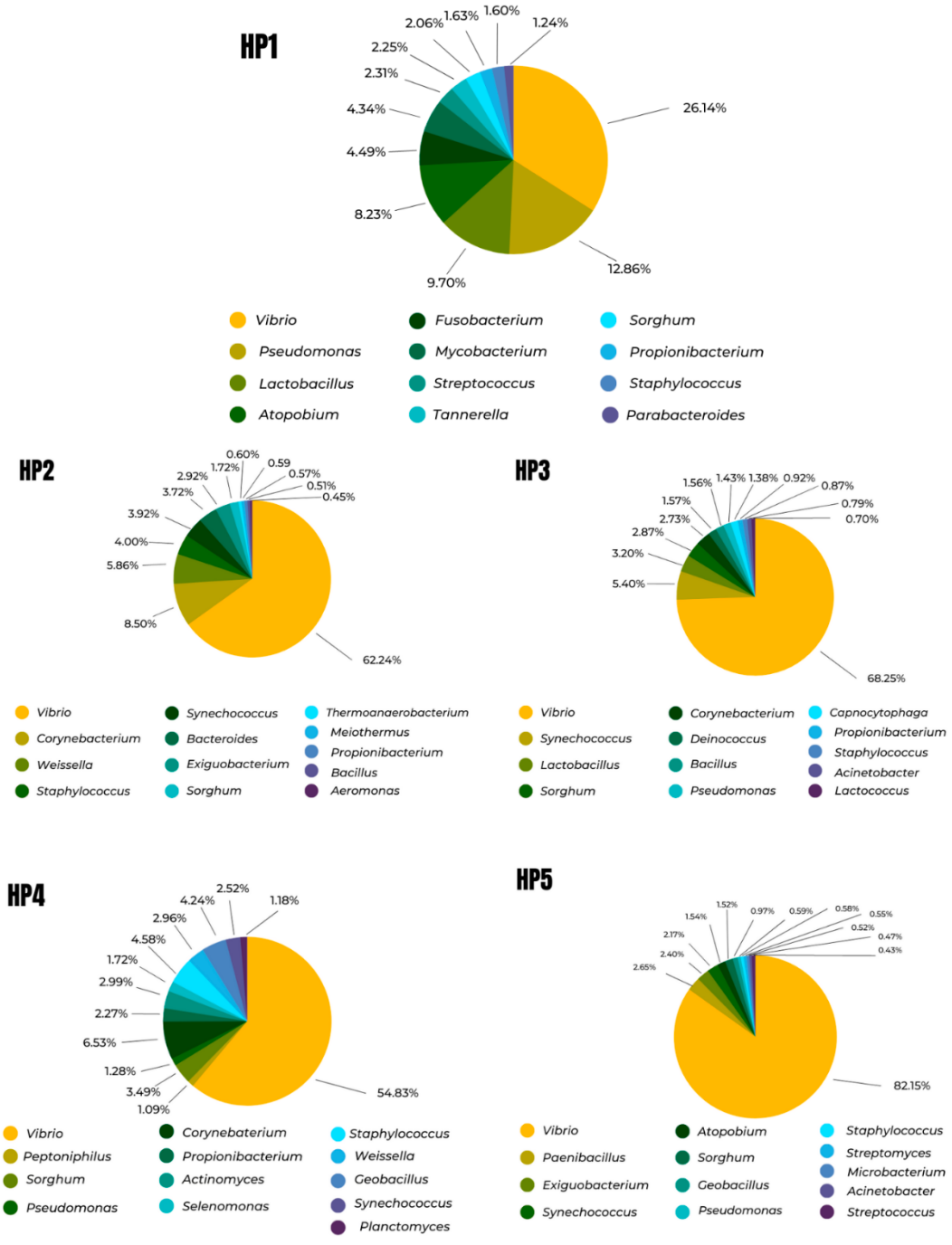


Figure 2. Relative abundance at the genus level of the microbiota from white shrimp hepatopancreas (*P. vannamei*). Farm 1, HP1: non-AHNPD hepatopancreas; HP2 to HP5: diseased hepatopancreas AHPND.
Figura 2. Abundancia relativa de microbiota a nivel de género del hepatopáncreas de camarón blanco (*P. vannamei*). Granja 1, HP1: hepatopáncreas negativo a AHPND; HP2 a HP5: hepatopáncreas positivo a AHPND.

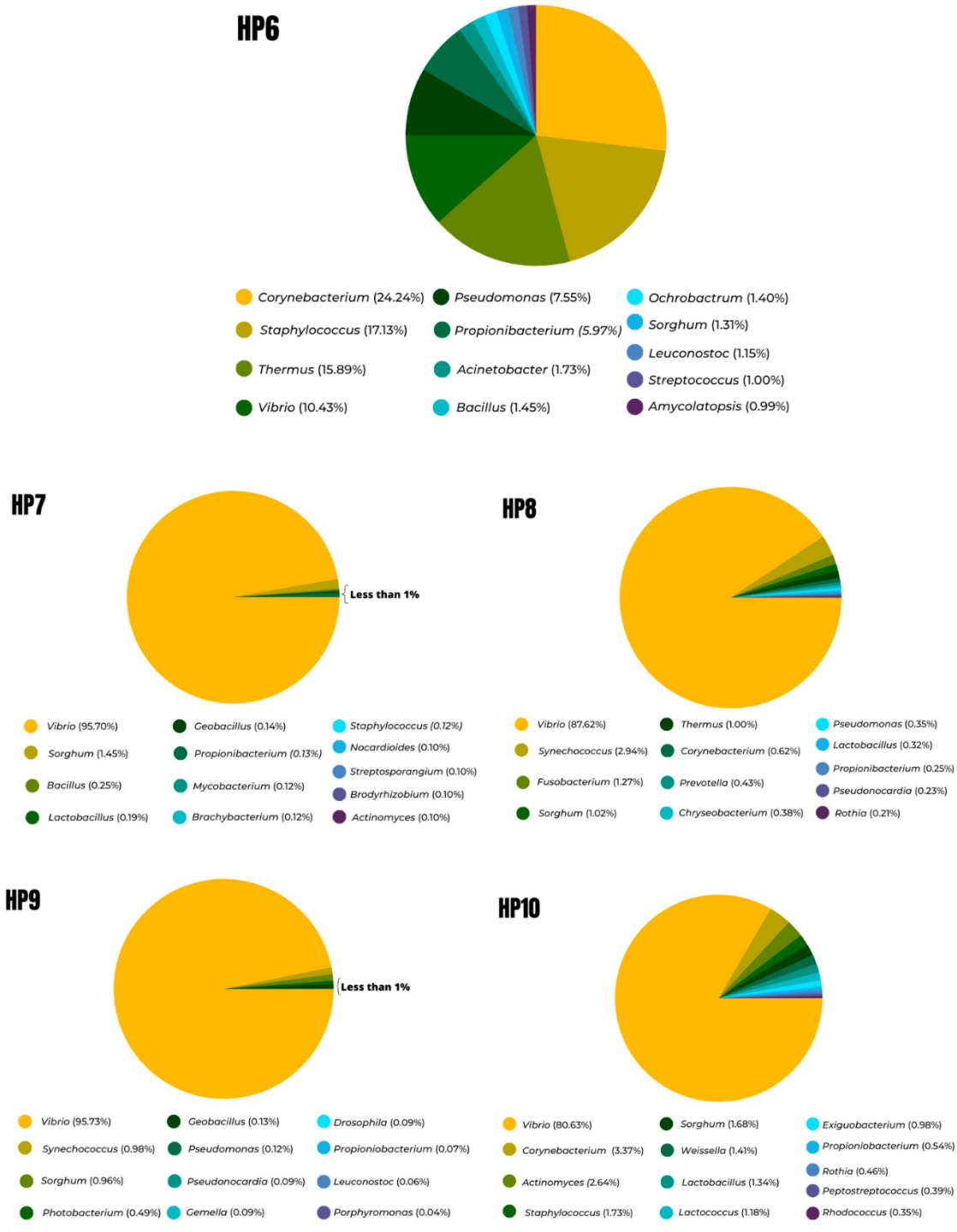


Figure 3. Relative abundance at the genus level of the microbiota from white shrimp hepatopancreas (*P. vannamei*). Farm 2, HP6: non-AHPND hepatopancreas; HP7 to HP10: diseased hepatopancreas AHPND.
Figura 3. Abundancia relativa de microbiota a nivel de género del hepatopáncreas de camarón blanco (*P. vannamei*). Granja 2, HP6: hepatopáncreas negativo a AHPND; HP7 a HP10: hepatopáncreas positivos a AHPND.

dominance of *Proteobacteria* in different parts of the shrimp digestive tract. Research carried out by Gainza *et al*. (2017) and Garibay-Valdez *et al*. (2020) showed a higher prevalence of the *Proteobacteria* phylum in the shrimp intestine at the nursery phase and harvest stages. Rungrassamee *et al*. (2014) demonstrated the predominance of *Proteobacteria* in the intestine of shrimp *Penaeus monodon* in wild-caught and domesticated in Thailand. The natural distribution of the bacteria belonging to the phylum *Proteobacteria* in seawater and its presence in the sediments of culture is the principal pathway of infiltration of these bacteria in different parts of the shrimp digestive tract (Sung *et al*., 2001; Velazquez-Roman *et al*., 2012).

Phylum *Firmicutes* represented the second most abundant phylum in the hepatopancreas of the non-infected shrimp. Some bacteria belonging to this phylum are considered probiotics in aquaculture, improving the shrimp's immune system, and controlling pathogens; therefore, its high abundance could be attributed to the feeding practices during shrimp production (Qi *et al*., 2009; Ruiz-Zarzuela and Blas, 2013; Vargas-Albores *et al*., 2016).

On the other hand, the phylum *Firmicutes* were reduced in several samples of shrimp infected with AHPND, particularly compared with *Proteobacteria*. This reduction was mostly observed in samples HP7 and HP9 from farm 2 (Fig. 3), where the phylum *Proteobacteria* is the most abundant. Although *Firmicutes* bacteria were not eliminated in infected shrimp, it was evident that the disease affected this phylum. Similarly, Rungrassamee *et al*. (2016) studied the bacterial dynamics in the intestines of the black tiger shrimp under the pathogenic *Vibrio harveyi* challenge, showing the prevalence of four major phyla *Firmicutes Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria*, where *Proteobacteria* predominated, and the others showed less prevalence.

The third phylum with the higher abundance in all samples of non-AHPND hepatopancreas was *Actinobacteria* (Fig. 1). Although the participation of this phylum in animal nutrition and the production of some bioactive components has been addressed in aquaculture (Das *et al*., 2008), it showed a considerable reduction when shrimp were infected with AHPND. This reduction of some genera, such as *Atopobium* spp. (8.23 to 1.54 %) (Fig. 2), *Amycolatopsis* spp. (0.99 % to undetected), *Corynebacterium* spp. (24.24 to 0.62 %), and *Propionibacterium* spp. (5.97 to 0.07 %) (Fig. 3), might be related to poor nutrients absorption, which generates a slow growth, being one of the main symptoms of AHPND, which could have favorable conditions for the development of this disease.

To understand the hepatopancreas microbiota influence in AHPND disease, it is important to understand the composition at the genus level in the non-AHNPD group. Based on the PCA analysis, it is evident that the microbiota composition differs significantly between healthy organisms (HP1, HP6) and infected ones (HP2-HP5, HP7-HP10). *Vibrio* spp., which was found to be more abundant in all samples, has a significant influence and strongly determines the direction (vector) of the microbiota. Other microorganisms, such as *Corynebactrrium* spp., *Propionibacterium* spp., *Pseudomonas* spp., and *Streptococcus* spp., were also abundant and influential, but the presence of *Vibrio* spp. appears to have a more significant impact (Fig. 4).

A microbiota with a diverse relative abundance among genera was observed, registering *Vibrio* spp. as the most abundant genus (10.43 - 26.14 %), followed by *Pseudomonas* spp. (7.55 - 12.86 %), *Propionibacterium* spp. (2.25 - 5.97 %), among others in both farms (Figs. 2 - 3). In some marine species, such as crabs, oysters, and fish, the microbiota is composed of a wide bacterial diversity, which varies depending on the developmental stages (Ward *et al*., 2009; Trabal *et al*., 2014), and this diversity is related to the state of health (Martin-Antonio *et al*., 2007; Xiong *et al*., 2016).

The presence of PirABvp toxins was determined by PCR analysis; this detects the toxin-producing genes in plasmid pVPA3-1, so the *Vibrio* genus found in the non-AHPND do not present this plasmid. However, the *Vibrio* genera found in the AHPND group carry the genes producing PirABvp toxins. The genus *Vibrio* exceeds more than 50 % relative abundance in farm 1 samples, reaching 82.15 % (Fig. 2); on farm 2, the samples exceeded more than 95 % relative abundance (Fig. 3). The ability of the *Vibrio* species to produce PirABvp toxins generates an advantage over the various bacterial genera present in the hepatopancreas; this may be involved in such a high reduction in the abundances relative to the other genera. Previous works have considered *V. parahaemolyticus* as the causative agent of AHPND (FAO, 2013; Tran *et al*., 2013; Kondo *et al*., 2014). Other studies have mentioned that AHPND has occurred not only due to *V. parahaemolyticus* but also to *V. owensii* and *V. harveyi,* which have acquired the ability to reproduce this pathology (Kondo *et al*., 2015; Liu *et al*., 2018).

Based on the Figure 5, it is evident that the organisms infected with AHPND can be grouped based on their microbiota, which clearly distinguish them between the healthy and uninfected samples (pirABVP genes not detected). The microbiota found in healthy organisms or those without AHPND is different from the one found in organisms with AHPND (HP1, HP6). This is because they are grouped in a separate vector or component that explains 34.5 % of the variance (CP1+CP2). This correlation can be observed and confirmed through the Clustered Heat Map (Fig 6 - supplementary material).

In this study, some bacterial pathogens were detected at the species level, belonging to the genus *Vibrio* related to diseases of aquatic animals (*unpubl. data*). Our research found that the increased numbers of *Vibrio* in shrimp undergoing AHPND influenced the bacterial structure at the genus level.

Finally, the AHPND group showed a minor presence of some bacteria from the genus *Geobacillus* spp. (0.13 %), *Brachybacterium* spp. (0.12 %), *Streptosporangium* spp. (0.10 %), *Actinomyces* spp. (0.10 %), and *Drosophila* spp. (0.09 %) when the genus *Vibrio* is more abundant. In contrast, these genera of bacteria were not found in the microbiota of the

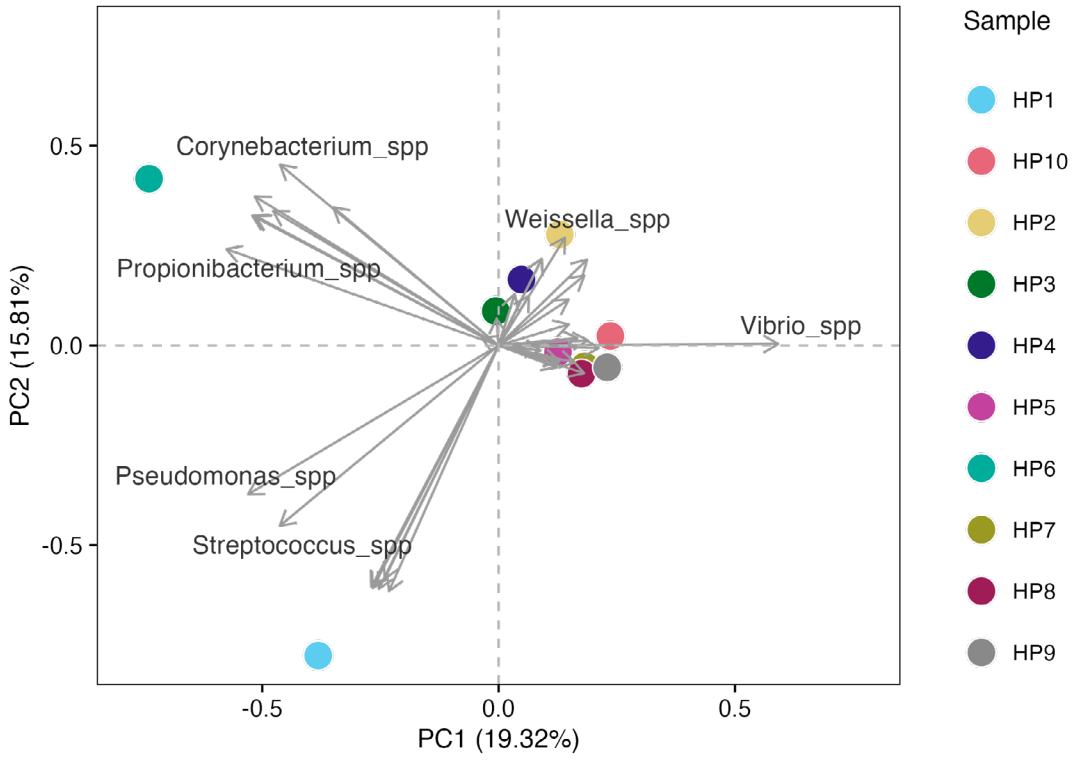


Figure 4. Principal component analysis (PCA). Vector dispersion and correlation of relative abundance of microbiota at the genus level. HP1 and HP6: non-AHPND hepatopancreas; HP7 to HP10: diseased hepatopancreas AHPND.
Figura 4. Análisis de componentes principales (PCA). Dispersión vectorial y correlación de abundancia relativa de microbiota a nivel de género. HP1 y HP6: hepatopáncreas negativos a AHPND; HP7 a HP10: hepatopáncreas positivos a AHPND.

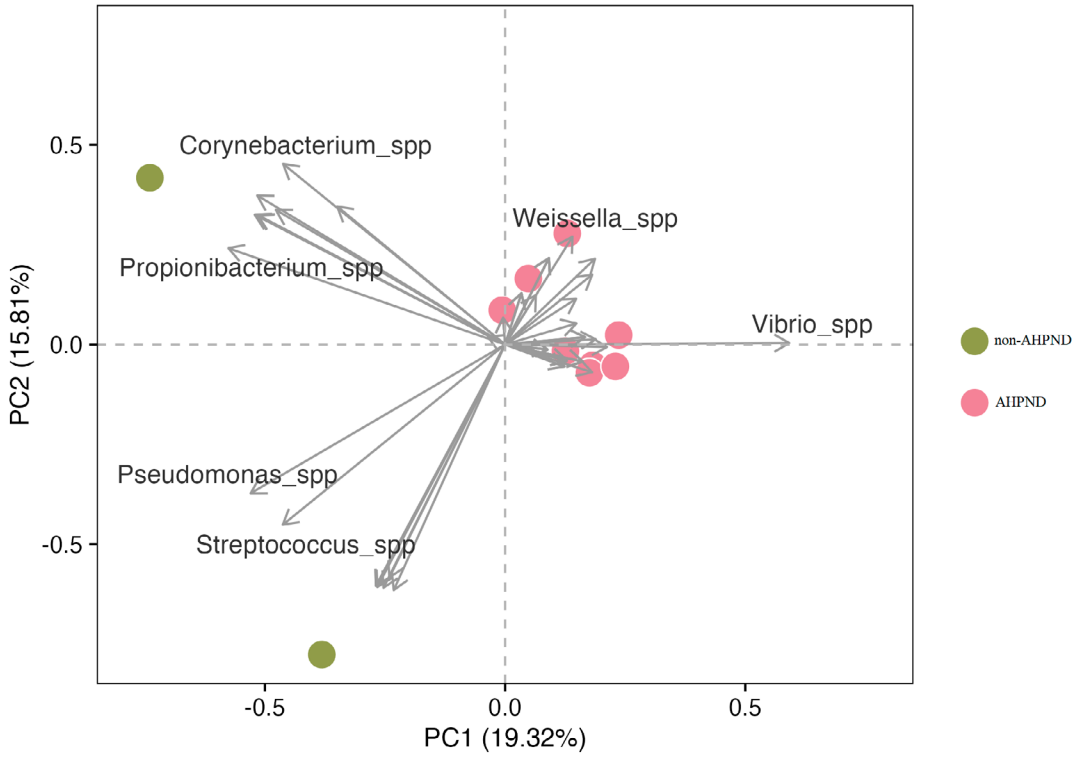


Figure 5. Principal component analysis (PCA). Vector dispersion and correlation of relative abundance of microbiota at the detection level of pirABvp genes in the samples.
Figura 5. Análisis de componentes principales (PCA). Dispersión vectorial y correlación de Abundancia relativa de microbiota a nivel detección de genes de pirABvp en las muestras.

non-AHPND group, suggesting the possibility of other opportunistic bacteria colonizing the hepatopancreas when the relative abundance of *Vibrio* species exceeds 90 %. In addition, the Shannon index in the AHPND organism confirmed the decrease in microbiota diversity, which in addition to the modification of the taxonomic profile, indicates a dysbiosis that could harm the host's health since the microbiota is considered an annexed organ that provides vital functions (Xiong *et al*., 2016). It is important to mention that microbiota found among the farms identified at the genus level, showed a difference in the species and their relative abundance; this variation may be attributed to factors such as the location of the farms and the type of feeding provided by the farms and others.

CONCLUSION

In conclusion, the non-AHNPD and AHPND hepatopancreas microbiota is mainly composed of the phylum *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*, considered core microbiota. The presence of the pirABvp toxins, causal of AHPND, is a clear advantage of the *Vibrio* genus bacteria over the other microorganisms present, although some of these have diverse functions in shrimp development. Only some bacteria of the phylum *Firmicutes* remained in the presence of the *Vibrio* genus; these could be used as an alternative to attenuate the dysbiosis caused by the pathogen. Understanding the microbiota composition brings new insights into controlling and reducing the risk of the appearance of AHPND in shrimp culture ponds.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to express our gratitude to Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2023).

REFERENCES

Dabu, I.M., Lim, J.J., Arabit, P.M.T. and Orense, S.J.A.B. 2015. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. Aquaculture Research, 48: 792-799. doi: 10.1111/are.12923

Das, S., Ward, R. and Burke, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 81: 419-429. doi: 10.1007/s00253-008-1731-8

Dhar, A.K., Piamsomboon, P., Aranguren-Caro, L.F., Kanrar, S., Adami, R. and Juan, Y.S. 2019. First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. Diseases of Aquatic Organisms, 132: 241-247. doi: 10.3354/dao03330

Duan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Zhang, J. and Xiong, D. 2019. Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. Fish and Shellfish Immunology, 88: 142-149. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.047

De Paiva Maia, E., Alves Modesto, G., Otavio Brito, L., Olivera, A., Vasconcelos, T.C. and Gesteira, F. 2013. Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. Latin American Journal of Aquatic Research, 41: 126-137. doi: 10.3856/vol41-issue1-fulltext-10

Food and Agriculture Organization (FAO). 2013. Technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO/MARD. [https://www.fao.org/3/i3422e/i3422e.pdf]. Reviewed: June 15, 2020.

Gainza, O., Ramírez, C., Ramos, A.S. and Romero, J. 2017. Intestinal microbiota of white shrimp *Penaeus vannamei* under intensive cultivation conditions in Ecuador. Microbial Ecology, 75: 562-568. doi: 10.1007/s00248-017-1066-z

Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T. and Martínez-Córdova, L. 2020. Taxonomic and functional changes in the microbiota of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) associated with postlarval ontogenetic development. Aquaculture, 518: 734842.

Han, J.E., Choi, S-K., Han, S-H. and Lee, S.C. 2020. Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Korea. Aquaculture, 524: 735284. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735284

Han, J., Tang, K., Tran, L. and Lightner, D. 2015a.Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 115: 245-251. doi: 10.3354/dao02906

Han, J., Tang, K., Tran, L. and Lightner, D. 2015b. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 113: 33-40. doi: 10.3354/dao02830.

Holt, C., Bass, D., Stentiford, G. and van der Giezen, M. 2021. Understanding the role of shrimp gut microbiome in health and disease. Journal of Invertebrate Pathology, 186. doi: 10.1016/j.jip.2020.107387.

Hong, X., Lu, L. and Xu, D. 2015. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture International, 24: 577-593. doi: 10.1007/s10499-015-9948-x

Illumina. 2013. 16S Metagenomic sequencing library preparation. [https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.htm]. Reviewed: November 10, 2021.

Kondo, H., Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Mavichak, R., Unajak, S. and Nozaki, R. 2014. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. Genome Announcements, 2: 1-2. doi: 10.1128/genomeA.00221-14

Kondo, H., Van, P.T. and Dang, L.T. 2015. Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute diseased shrimp in Vietnam. Genome Announcements, 33: e00978-15. doi: 10.1128/genomeA.00978-15

Leyton, Y. and Riquelme, C. 2008. Vibrios in the marine coastal systems. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 43: 441-456. doi: 10.4067/S0718-19572008000300004

Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S. and Zhao, Q. 2018. Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Reviews in Fisheries Science y Aquaculture, 26: 381-399. doi: 10.1080/23308249.2018.1440530

Liu, L., Xiao, J., Zhang, M. and Zhu, W. 2018. A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology, 153: 156-164. doi: 10.1016/j.jip.2018.02.005

Martin-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R. and Ñabella, A. 2007. Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. Aquaculture Research, 38: 1213-1222. /doi: 10.1111/j.1365-2109.2007. 01790.x

Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, 151: 333-349. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01487-1

Qi, Z., Zhang, X., Boon, N. and Bossier, P. 2009. Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems, and prospect. Aquaculture, 290: 15-21. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.012

Ruiz-Zarzuela, I., Pérez-Sánchez, T., Blas, I. and Balcázar, J.L. 2013. Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture 6:1-14.

Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S. and Karoonuthaisiri, N. 2016. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 133: 12-19. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.004

Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P. and Karoonuthaisiri, N. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Plos One, 9: e91853. doi: 10.1371/journal.pone.0091853

Salipante, S.J., Sengupta, D.J., Rosenthal, C., Costa, G., Spangler, J., Sims, E.H. and Hoffman, N.G. 2013. Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. Plos One, 8: e65226. doi: 10.1371/journal.pone.0065226

Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T.W. and Mavichak, R. 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. [https://enaca.org/?id=96]. Reviewed: February 8, 2019.

Sousa, L.G., Cuartas, E.I. and Petriella, A.M. 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. Biocell, 29: 25-31.

Staley, C., Unno, T., Goulz, T.J. and Jarvis, B. 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the upper Mississippi river. Journal of Applied Microbiology, 115: 1147-1158. doi: 10.1111/jam.12323

Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Ting, Y.Y. and Chao, W.L. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture, 192: 101-110. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00458-0

Tang, K.F.J., Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R. and MacKinnon, B. 2020. Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. FAO Fisheries and Aquaculture Circular 1190. FAO, Rome.

Trabal, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F. and Romero. 2014. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas*, and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiology Ecology,* 88: 69-83.doi: 10.1111/1574-6941.12270

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K. and Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 105: 45-55. doi: 10.3354/dao02621

Tran, L., Redman, R.M., Lightner, D.V. and Fitzsimmons, K. 2013. EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. Global Aquaculture Advocate. [https://www.globalseafood.org/advocate/ems-ahpns-infectious-disease-caused-by-bacteria/]. Reviewed: September 13, 2021.

Van Hai, N. and Fotedar, R. 2010. A review of probiotics in shrimp aquaculture. Journal of Applied Aquaculture, 22: 251-266. doi: 10.1080/10454438.2010.500597

Vargas-Albores, F., Martínez-Porchas, M., Arvayo, M.A. and Villalpando-Canchola, E. 2016. Immunophysiological response of Pacific white shrimp exposed to a probiotic mixture of proteobacteria and firmicutes in farm conditions. North American Journal of Aquaculture, 78: 193-202. doi: 10.1080/15222055.2016.1167797

Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Villafaña-Rauda, S. and Canizalez-Roman, A. 2012. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. Applied and Environmental Microbiology, 78: 1794-1803. doi: 10.1128/AEM.06953-11

Větrovský, T. and Baldrian, P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. Plos One, 8: 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0057923

Vogt, G. 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. Journal of morphology, 280: 1405-1444. doi: 10.1002/jmor.21040

Wang, W., Wu, X., Liu, Z. Zheng, H. and Cheng, Y. 2014. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: Gene Discovery in the Comparative Transcriptome of Different Hepatopancreas Stages. PLOS ONE, 9 (1): e84921. doi: 10.1371/journal.pone.0084921

Ward, N.L., Steven, B. and Penn, K. 2009. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. Extremophiles, 13: 679-685. doi: 10.1007/s00792-009-0252-4

Weinstock, M.A. 2013. Epidemiology and UV exposure. Journal of Investigative Dermatology, 133: E11-E12. doi: 10.1038/jid.2013.248

Xiong, J., Dai, W. and Li, C. 2016. Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: the guidelines from an ecological perspective. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 6947-6954. doi: 10.1007/s00253-016-7679-1

Yang, Y., Chen, I., Lee, C. and Chen, C. 2014. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute. Genome, 2: 2-3. doi: 10.1128/genomeA.00816-14

Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y. and Qiao, F. 2016. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. Aquaculture, 454: 72-80. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.014

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Screening local marine habitats suggests a novel *Bacillus subtilis* MZ1 strain as a potential fatty acid producer

El cribado de hábitats marinos locales sugiere una nueva cepa, *Bacillus subtilis* MZ1, como un posible productor de ácidos grasos

Mohamed Aboelnaga[1], Briksam S. Mohamed[1], Maha Azab[2], Mohammad Hegazy[3], Sara Saad[4], Dalia Abdel-Fattah H. Selim[5], Saadiya El-Nahas[6], Sabha M. El-Sabbagh[1], Muhammad Zayed[1]*

[1] Department of Botany and Microbiology, Faculty of Science, Menoufia University, Shebin El-Kom, Egypt.
[2] Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, Tanta, Egypt.
[3] Department of Chemistry, Menoufia University, Shebin El-Kom, Egypt.
[4] Ministry of Health and Population, Shebin El-Kom, Egypt.
[5] Department of Agricultural Botany, Faculty of Agricultural, Menoufia University, Shebin El-Kom, Egypt.
[6] Microbiology Department, Al-Salam University, Kafr El-Zayat, Gharbia, Egypt.

ABSTRACT

Within this academic research article, a bacterium isolated from a marine soil environment near the Mediterranean Sea is observed to possess the potential for producing various fatty acids, particularly *n*-caproic and oleic acids, as evidenced by FAME profiling. Furthermore, the introduction of glucose into the growth medium enhances the production of caprylic acid rather than caproic acid. The 16S rDNA sequencing suggested that the MZ1 strain belongs to *Bacillus subtilis* and is closely related to many halophilic species. FAME profiling reveals that the isolated MZ1 is competent in the total production of fatty acids compared to other marine bacterial candidates. Furthermore, the results indicate that MZ1 is efficient in the production of many other fatty acids. This exploration suggests that the marine bacterium *Bacillus subtilis* MZ1 can be used for fatty acids synthesis, which could be valuable for biodiesel production and other applications.
Keywords: *Bacillus subtilis*, fatty acids, gas chromatography, caproic acid, caprylic acid, reverse β-oxidation.

RESUMEN

Dentro de este artículo de investigación académica, se observa que una bacteria aislada de un entorno de suelo marino cerca del mar Mediterráneo posee el potencial de producir diversos ácidos grasos, especialmente los ácidos n-caproico y oleico, según lo evidencia el perfil FAME. Además, la introducción de glucosa en el medio de crecimiento potencia la producción de ácido caprílico en lugar de ácido caproico. La secuenciación del 16S rDNA sugiere que la cepa MZ1 pertenece a *Bacillus subtilis* y está estrechamente relacionada con muchas especies halófilas. El perfil FAME revela que la cepa MZ1 aislada es competente en la producción total de ácidos grasos en comparación con otros candidatos bacterianos marinos. Además, los resultados indican que MZ1 es eficiente en la producción de muchos otros ácidos grasos. Esta exploración sugiere que la bacteria marina *Bacillus subtilis* MZ1 puede ser utilizada para la síntesis de ácidos grasos, lo cual podría ser valioso para la producción de biodiesel y otras aplicaciones.
Palabras clave: *Bacillus subtilis*, ácidos grasos, cromatografía de gases, ácido caproico, ácido caprílico, oxidación β inversa.

INTRODUCTION

Since the 1800s, heavy dependence on fossil fuels for industrial activities has greatly hastened global climate change. This has led to a hotter and drier climate, higher atmospheric carbon dioxide levels, ozone depletion, rising sea levels, and habitat loss. Ecosystems have transitioned from carbon sinks to carbon sources, emitting gases like carbon dioxide and methane, ultimately jeopardizing the food supply. One solution to minimize the adverse effects of climate change, is to replace fossil fuels with renewable sources such as solar energy or other alternative like biofuels. For example, the synthesis of fatty acids by microorganisms could contribute to the preservation of agricultural land. In addition to their nutraceutical properties, microbial fatty acids have been employed in medicine for their antibacterial activity (Hegazy *et al.*, 2020; Shaaban *et al.*, 2021; 2022; 2023; Zayed *et al.*, 2022).

Harnessing microbes for fatty acids production was well-studied by German scientists during World War II (Ratledge and Lippmeier, 2017). Since then, numerous microorganisms have undergone screening for their capacity to produce fatty acids, revealing several notable candidates such as *Clostridium*, recognized for synthesizing and storing middle-chain n-alkanes, and *Vibrio furnissii*, known for hydrocarbons resembling kerosene and light oil. Actinomycetes such as *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* have demonstrated enzymatic biosynthesis and accumulation of triacylglycerols (TAG), a crucial precursor for microbial biodiesel production. Noteworthy producers of Eicosapentaenoic acid (EPA) include *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia*, *Vibrio*, and *Psychromonas*. Additionally, *E. coli* and green algae are recognized for TAG production. *Yarrowia lipolytica*, an oleaginous yeast, is renowned for TAG production and has been genetically engineered for enhanced yield (Shulse and Allen, 2011; Lennen and Pfleger, 2013; El Razak *et al.*, 2014; Janßen and Steinbüchel, 2014). These microorga-

*Author for correspondence: Muhammad Zayed
e-mail: mhdzayed@science.menofia.edu.eg
Received: June 3, 2023
Accepted: December 7, 2023
Published: January 4, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2058

nisms accumulate lipids, subsequently converted into fatty acids, which serve as feedstocks for biodiesel production via trans-esterifying fatty acids with alcohol to yield biodiesel (fatty acid methyl or ethyl esters) (Hoekman *et al*., 2012; Diomandé *et al*., 2015; Rana *et al*., 2019). Herby, microbes can be harnessed as a renewable alternative to conventional diesel fuel and aligns with sustainability goals by offering an environmentally friendly alternative to fossil fuels (Kumar *et al*., 2020).

Although microbial production of fatty acids saves agricultural land, it remains comparatively costly when compared to counterparts derived from plants (Osorio-González *et al*., 2019). Therefore, the search for microbial species that produce massive amounts of fatty acids on inexpensive nutrients is still ongoing to minimize production costs. This research aimed to identify a competent bacterial species for efficient lipid production. Salinity has been found to trigger lipid accumulation in plants, algae, and bacteria (Monteoliva-Sanchez *et al*., 1993; Aziz *et al*., 2015; Hounslow *et al*., 2016; Atikij *et al*., 2019; El-Halmouch, 2019). However, salinity may induce the biosynthesis of saturated fatty acids rather than unsaturated ones (Atikij *et al*., 2019; El-Halmouch, 2019). As a result, the main target of this research was to explore bacteria that live in saline environments to identify a microbe with a natural ability to augment fatty acids as an adaptive response to salinity.

Until now, gas chromatography has served as an accurate tool for estimating fatty acid content; however, new cost-effective methods have been developed to identify lipid-producing candidates. For example, microbial lipids, especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs), enable PUFA-producing microbes to withstand the damaging effects of H_2O_2 in a NaN_3-containing growth medium. These lipids act as shields against the H_2O_2 oxidative damage (Tilay and Annapure, 2012). Additionally, the ability of the microbe to reduce the colorless 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) into the red-colored triphenyl formazan (TPF) expresses its capacity on lipid biosynthesis. Only cells with active dehydrogenases can convert TTC to red TPF, thus active dehydrogenases indicate lipid production and promote TTC reduction (Ke *et al*., 2000; Xue *et al*., 2017). Herby, these methods were employed to identify the most efficient lipid-producing candidate.

MATERIALS AND METHODS

Sampling procedure

Soil samples were amassed from three different geographic marine locations adjacent to the Mediterranean Sea. These locations are from Alexandria, Baltim, and Damietta cities (Fig. 1). After removing a 2 cm from the surface of the soil with a sterilized spatula, each sample was taken with a sterilized Peterson grab sampler, preserved in a sterilized polythene bag, and labeled appropriately. The collected samples were preserved in the dark at 4 °C until further analyses.

Bacterial isolation, purification, and culture conditions

The collected soil samples were serially diluted with sterilized seawater to get 10^{-1} to 10^{-6} CFU (Colony Forming Units) per one-gram soil on plates containing nutrient agar growth media that contains 5 g NaCl, 2 g beef extract, 1 g yeast extract, 5 g peptone, and 20 g agar dissolved in distilled water for a total volume of 1 L (Downes and Ito, 2001). After a two days incubation period at 30 °C, pure cultures of different isolates were acquired according to the colony morphological characters. Later, pure strains were saved. For storage purposes, the isolates were preserved in 50 % glycerol and 50 % nutrient broth at - 20°C (Downes and Ito, 2001; Oliveira *et al*., 2021). In either nutrient agar or nutrient broth, the seawater was used in place of the distilled water to maintain the proper growth of marine isolates.



Figure 1. A Google map of Egyptian Nile Delta reaching the Mediterranean Sea where soil sample were collected. Blue stars indicate the geographic sample collection.
Figura 1. Un mapa de Google del Delta del Nilo egipcio que se extiende hasta el Mar Mediterráneo, donde se recopilaron muestras de suelo. Las estrellas azules indican la ubicación geográfica de la recopilación de muestras.

Sorting out the potential fatty acids-producing isolates

Potential isolates with the competence of producing fatty acids were selected according to two assays. Initially, the potency of each strain to survive over different H_2O_2 concentrations (0.01, 0.5, 1.0 % prepared from 30 % H_2O_2 stock solution) was evaluated by H_2O_2-plate assay (Tilay and Annapure, 2012). Moreover, the ability of each H_2O_2-resistant isolate to reduce TTC into TPF was tested by spectrophotometer at 485 nm, according to Ryan *et al*. (2010). Only candidates that showed resistance against H_2O_2 and reduced TTC into TPF were selected for GC-MS analysis. An example of the result of these two tests is shown in Fig. 2 for the bacterial isolate #2.

FAME profiling

Bacterial isolates that can produce fatty acids were grown on 50 mL seawater-based nutrient broth (SNB) cultures for 24 h, and the pellets were collected by centrifugation at 4,000 *g* for 15 m. Afterward, the pellets were rinsed and prepared according to Rogers and Burns (1994). Total lipids were extracted from the collected pellets according to Folch *et al*. (1957). Finally, samples were subjected to saponification and methylation to generate fatty acid methyl esters (FAME). He-

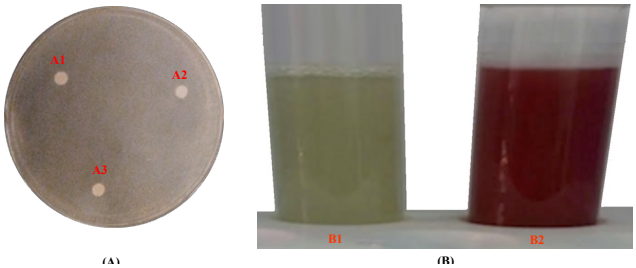


Figure 2. (A) The H_2O_2 plate assay for the bacterial isolate #2, where PUFAs producers generate no inhibition zone at different H_2O_2 concentrations (A1, A2 and A3). (B) The 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) assay for the bacterial isolate #2 as shown in B1. After incubation at 25 ºC for 1h.; the formation of red color is considered as a positive result due to the reduction of TTC to the red-colored triphenyl formation as seen in B2.

Figura 2. (A) La prueba de placa de H_2O_2 para el aislado bacteriano #2, donde los productores de PUFAs no generan una zona de inhibición a diferentes concentraciones de H_2O_2 (A1, A2 , A3). (B) La prueba de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) para el aislado bacteriano #2, como se muestra en B1. Después de incubarse a 25 ºC durante 1 h, la formación de color rojo se considera un resultado positivo debido a la reducción de TTC a la formación trifenil roja, como se ve en B2.

reafter, the FAME were extracted and then 1 mL was injected into the gas chromatography device H.P. (Hewlett Packard) 6890N Gas Chromatograph connected to Agilent 5973 Mass Spectrometer at 70 eV (m/z 50 – 550); source at 230 °C and quadruple at 150 °C) in the EI mode with an HP-5ms capillary column (30 m 0.25 mm i.e., 0.25 mm film thickness; J and W Scientific, USA). The carrier gas, helium, was maintained at a flow rate of 1.0 mL/min. The inlet temperature was maintained at 300 °C and the oven was programmed for 2 min at 150 °C, then increased to 300 °C at 4 °C/min., and maintained for 20 min at 300 °C (Watanabe *et al*., 1996). Based on the interpretation of mass spectrometric fragmentation, confirmed by comparing our compounds' retention times and fragmentation patterns with the Supelco 37-component FMAE standard mixture. The microbial candidate with the peak of total fatty acid production was selected for molecular identification and further experiments.

Microbial growth optimization

The study selected the most promising candidate based on its proficiency in augmenting fatty acid production, as revealed by FAME analysis. The chosen candidate's growth was then assessed using various growth media that were inoculated by 0.5 McFarland of the candidate isolate. The seawater-based nutrient broth medium (SNB) emerged as the most favorable, and its components were fine-tuned to enhance and optimize the growth conditions.

First, the optimal pH was determined from 6 - 6.5 - 7 - 7.5 - 8. Second, optimal temperature was evaluated from 15 - 40 C. Finally, various carbon and nitrogen sources were evaluated to optimize the candidate's ability to reduce TTC into TPF. In the case of the carbon source, the yeast extract of the SNB was replaced by 2 % of different carbon sources such as lactose, mannitol, glucose, fructose, sucrose, starch, and dextrose. For the nitrogen source, peptone and beef extract were replaced by four different nitrogen sources, at 2 % of either potassium nitrate, ammonium sulfate, ammonium chloride, or ammonium nitrate. Carbon or nitrogen surrogates were sterilized via a sterile Millipore filter (0.45 µm) before using them within the growth media (Wang *et al*., 2007). Natural wastes like sugarcane and banana peels also replaced both the carbon and nitrogen sources. All treatments were incubated for 48 h at the optimum temperature and the optimum pH that was noted from the previous results. Later, all optimal conditions were employed to collect the culture biomass of the selected candidate, and FAME profiling was estimated under the best growth conditions as previously explained.

DNA barcoding

The 16S rDNA sequencing was performed at the Macrogen Inc., Seoul, South Korea. In brief, DNA extraction and purification were performed via the DNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), as described by the supplier's protocol. Purified DNA was considered pure when the OD_{260}/OD_{280} ratio was around 1.8, and the OD_{260}/OD_{230} ratio was about 2.0. Accordingly, the polymerase chain reaction (PCR) was performed with 27F/1492R primers according to Zayed *et al.* (2022). The PCR thermal gradient program was a single cycle of 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 120 s, and 68 °C for 90 s, followed by a final extension at 68 °C for 10 min, and the reaction was held at 4 °C. Afterwards, the product was purified and sequenced using Sanger (dideoxy) technology via the sequencing kit BigDye (R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with four different primers, which were 785F, 907R, 337F, and 1100R. Sequencing was performed using ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type) at the Macrogen Inc., Seoul, South Korea. The sequences from ABI 3730 were assembled and the obtained contig was deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI Resource Coordinators 2016) with accession number OM946589.

The sequence was used as a query in a blastn algorithm with a cutoff E-value 1e-11 to retrieve the authentic 16S rDNA homologs (Zhang *et al*., 2000; Zayed and Badawi, 2020). The retrieved sequences were aligned using MAFFT version 7 (Katoh *et al*., 2019). Maximum likelihood phylogenetic tree was inferred assuming the lowest BIC (Bayesian Information Criterion) score model which is F81+F+I (Nguyen *et al*., 2015; Kalyaanamoorthy *et al*., 2017; Hoang *et al*., 2018). The phylogenetic tree was visualized by using iTOL (Interactive Tree of Life) webserver (Letunic and Bork, 2016). The same phylogenetic analysis was repeated using the blast algorithm against bacterial type strains only and with the Maximum likelihood phylogenetic tree was inferred assuming the lowest BIC model which is HKY+F+I to reveal the closest type strain to MZ1.

RESULTS AND DISCUSSION

Lipids are high-energy storage molecules, and microorganisms foster their lipid biosynthesis as a response to stress conditions such as salinity, light, and temperature (Venkata Mohan and Devi, 2014). Although salinity may promote membrane fluidity by enhancing the desaturation levels of

the membrane lipids, it has been reported that the saturated fatty acids are accumulated dramatically in response to salinity (Venkata Mohan and Devi, 2014). For example, the decline in the PUFAs content and the accumulation of saturated fatty acids (SFAs) and Mono saturated fatty acids (MUFAs) in the Antarctic *Chlamydomonas* sp. L4 can intensify the membrane's rigidity as affected by long-term salinity stress (Kan *et al.*, 2012). The increase in the inelasticity of the membrane in response to high salt concentrations enhances the cell's ability to control the passive permeability. Thus, the cell can uphold its internal osmotic pressure, which may protect it from shrinkage (Hosono, 1992). Therefore, salinity stress triggers lipid-accumulation, or fatty acids biosynthesis is a biochemical adaptive evolutionary trait of organisms dwelling in marine environments.

Thirty-five distinct bacterial species were purified according to their morphological characteristics on nutrient agar plates, as a result of screening bacterial species dwelling in the saline soil of three different geographic locations North of Egypt near the Mediterranean Sea (Fig. 1). To Select competent lipid-producing candidates, two characteristics were chosen from literature, the microbe's ability to tolerate H_2O_2 toxic effects, and its ability to reduce TTC (Ryan *et al.*, 2010; Tilay and Annapure, 2012). Previous studies indicated that the total fatty acid accumulation has a significant positive correlation with the ability of the microorganism to reduce TTC into TPF. As such, TTC can be absorbed by living cells (Zhu *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2010; El Razak *et al.*, 2014). Active dehydrogenases are thought to be involved in reducing TTC. For example, the dehydrogenase Δ5-desaturase is hypothesized as a TTC oxidizing agent (Zhu *et al.*, 2004; Gad *et al.*, 2016; Romano *et al*., 2020) as summarized in Fig. 3. Moreover, the TTC staining of *Mortierella alpina* M-23 mycelia is positively correlated with the total lipid content (Zhu *et al.*, 2004).

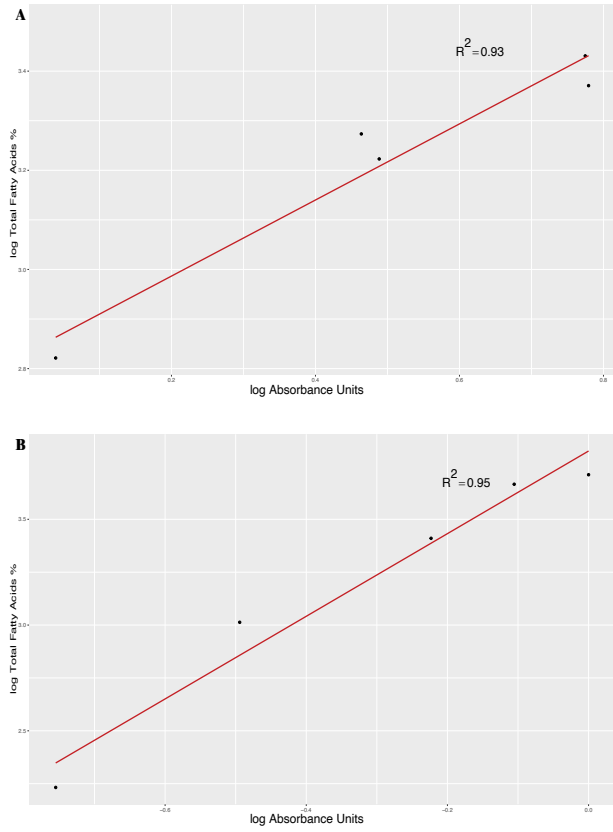


Figure 3. Predictions of total fatty acid contents from the TPF formation as measured by absorbance units as revealed from previous studies (Zhu *et al.*, 2004; Gad *et al.*, 2016). Data were extrapolated by using WebPlotDigitizer (Rohatgi, 2019). **(A)** The correlation of total fatty acids and the TPF absorbance units at 450 nm on the log scale as conducted by five different marine bacterial strains, which are AG9, AG10, AG18, AG26, and AG28 (Gad *et al.*, 2016). The adjusted R^2 of 0.93 at a P-value less than 5 % indicates a significant positive correlation. **(B)** The relationship between the total fatty acids and the absorbance units of TPF at 450 nm on the log scale after the TTC staining of the *Mortierella alpina* M-23 mycelia (Zhu *et al.*, 2004). The adjusted R^2 of 0.95 at a P-value less than 5 % indicates a significant positive correlation.
Figura 3. Las predicciones de los contenidos totales de ácidos grasos a partir de la formación de TPF medida en unidades de absorbancia, según se revela en estudios previos (Zhu et al., 2004; Gad et al., 2016). Los datos se extrapolaron utilizando WebPlotDigitizer (Rohatgi, 2019). **(A)** La correlación de los ácidos grasos totales y las unidades de absorbancia de TPF a 450 nm en escala logarítmica, realizada por cinco cepas bacterianas marinas diferentes, que son AG9, AG10, AG18, AG26 y AG28 (Gad et al., 2016). El R2 ajustado de 0.93 con un valor de P inferior al 5 % indica una correlación positiva significativa. **(B)** La relación entre los ácidos grasos totales y las unidades de absorbancia de TPF a 450 nm en escala logarítmica después de la tinción con TTC de las micelias de *Mortierella alpina* M-23 (Zhu et al., 2004). El R2 ajustado de 0.95 con un valor de P inferior al 5 % indica una correlación positiva significativa.

Fatty acids composition of the six selected candidates

Our target was then to identify which of the six candidates exhibits the highest efficiency in lipid production. The H_2O_2-assay plate, being a qualitative method, is insufficient to address this question. Additionally, TPF formation from TTC may lack the precision required to differentiate the lipid production capacities of efficient candidates. Therefore, gas chromatography was utilized to quantitatively assess the biosynthesized lipid quantities by each species under consistent pre-set conditions. FAME profiling was performed to reveal the bulk of intracellular and extracellular fatty acids compositions for all the six selected candidates (Figs. 4 and 5).

FAME profiles of the six bacterial candidates reveal that all of them are gram-positive due to the absence of liposaccharides and hydroxy fatty acids in their FAME profiles (Bisen *et al.*, 2012). It has been noted that candidate II recorded the highest lipid accumulation (78.5 %). The production of caproic acid attained 46.1 %, followed by oleic acid 3.1 %, which indicates the efficiency of this candidate to manufacture caproic acid when grown on nutrient agar. Other candidates were also seen to accumulate lipids but with fewer amounts. For example, candidates XIII and XVI have a total lipid production of 25.5 % and 36.3 %, respectively, with a pronounced production of monounsaturated fatty acids (MUFAs) such as erucic acid that reached 5.6 %, and oleic acid that reached 2.9 %. Also, candidate V has a total lipid production of 25 % with efficiency in producing oleic acid that attained 2.9 %. Although candidates XI and XIV recorded the lowest total lipid production (18.6 % and 15.2 %, respectively), they efficiently produced oleic acid by 2.9 %.

The creation of oleic acid was also maintained by candidate II (3.1 %) with efficiency higher than any other candidates. The results emphasize candidate II as the most potent for most fatty acids production, specifically caproic and oleic acids (Fig. 4).

Although this study used methods that look for PUFAs-producing bacterial species, it highlights a bacterial species that is most efficient in producing SFAs, mainly *n*-caproic acids. Substantially, the results of screening the fatty acids contents of six marine microbes showed salinity as an adaptive evolutionary regulator, which stabilizes the evolutionary trait of the MUFAs and SFAs accumulation in comparison with PUFAs, at least for these screened microbes (Figs. 4 and 5). Both MUFAs and SFAs are industrially valuable in enhancing fuel properties. Thus, finding a microbial species with an evolved trait of SFAs production will minimize the cost of biodiesel production, and will help improve its features.

Bacterial identification and phylogenetics

The partial 16S rDNA revealed that candidate II is *Bacillus subtilis* and its 16S rDNA sequence was deposited on NCBI (accession number OM946589.1). The Blastn algorithm showed that its closest subspecies is *Bacillus subtilis* spizizenii TU-B-10, with no gaps and a 100 % identity, which covered the query sequence that includes all 16S rDNA hypervariable regions from V1 to V9 (Fig. 6). However, the phylogenetic relationship of MZ1 with bacterial type strains revealed its uniqueness and its close affinity with numerous halophilic *Bacillus* species such as *B. swezeyi*, *B. haynessi* and *B. mojavensis*, where they all clustered in a distinct clade (Fig. 7). The *B. subtilis* MZ1 is phylogenetically closely related to many other halotolerant/marine *Bacilli* species (Figs. 6 and 7). For examples, *B. cabrialesii* and *B. tequilensis* can tolerate up to 2 % and 5 % NaCl, respectively. Additionally, the closest subspecies to MZ1 strain, which is *B. spizizenii* can tolerate 7 % NaCl (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019). Also, *B. swezeyi*, *B. haynessi* and *B. mojavensis* that are clustered in a distinct clade with MZ1 (Fig. 7) can tolerate 12 %, 12 % and 10 % NaCl (w/v), respectively (Reimer *et al.*, 2022).

Lipid-production optimization

Bacillus subtilis MZ1 had the highest levels of total lipid production (78.5 %) and the highest levels of production for each individual fatty acid when compared to the other candidates studied. *Bacillus subtilis* MZ1 was screened for its ability to grow on a variety of different media, and it was found to prefer nutrient broth, and seawater-based nutrient broth over the other growth media tested, particularly those based on natural wastes like sugarcane and banana peels (Fig. 8). The seawater-based nutrient broth was then chosen to adjust its components to maximise lipid production by *B. subtilis* MZ1 on it. First, the ability of lipid biosynthesis to reduce TTC into TPF was adjusted utilising diverse carbon and nitrogen sources, as well as variable pH and temperature degrees. The optimal conditions for *B. subtilis* MZ1 to reduce TTC into TPF were a pH of 7 and a temperature of 37 °C (Fig. 9). However, giving

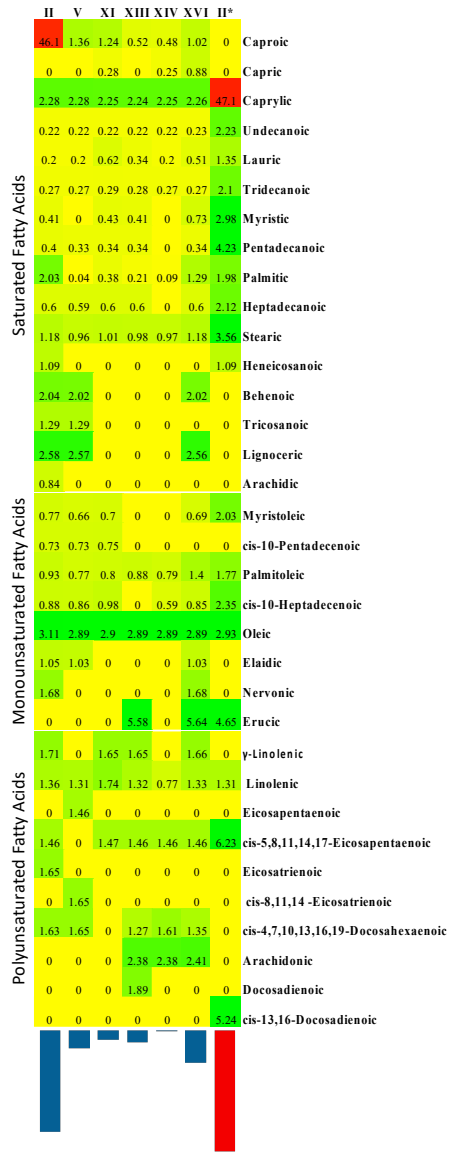


Figure 4. Heatmap displaying the FAME compositions of the selected bacterial candidates, after one day of growth on seawater-based nutrient broth cultures. Each column represents the fatty acid methyl ester composition for a bacterial pellet besides the supernatant. Each bacterial candidate has a Latin number, and the showed candidates were selected out of thirty-five unknown bacterial species. The last column (II*) represents candidate II that has been cultured on modified nutrients were glucose and ammonium sulfate were used as alternative carbon and nitrogen sources, respectively. The inverted bars represent the strength of the total fatty acid production for each candidate. The number shown in each color represents the concentration of each specified fatty acid in percentage.

Figura 4. Un mapa de calor que muestra las composiciones de FAME de los candidatos bacterianos seleccionados, después de un día de crecimiento en cultivos de caldo de nutrientes a base de agua de mar. Cada columna representa la composición de éster metílico de ácido graso para un pellet bacteriano además del sobrenadante. Cada candidato bacteriano tiene un número latino, y los candidatos mostrados fueron seleccionados de entre treinta y cinco especies bacterianas desconocidas. La última columna (II*) representa el candidato II que ha sido cultivado en nutrientes modificados, donde se utilizaron glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno alternativas, respectivamente. Las barras invertidas representan la intensidad de la producción total de ácidos grasos para cada candidato. El número mostrado en cada color representa la concentración de cada ácido graso especificado en porcentaje.

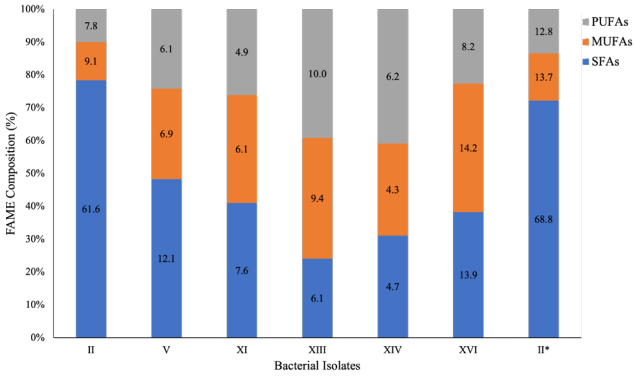


Figure 5. The total concentrations of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids as indicated by the FAME profiles.
Figura 5. Las concentraciones totales de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados según se indica en los perfiles de FAME.

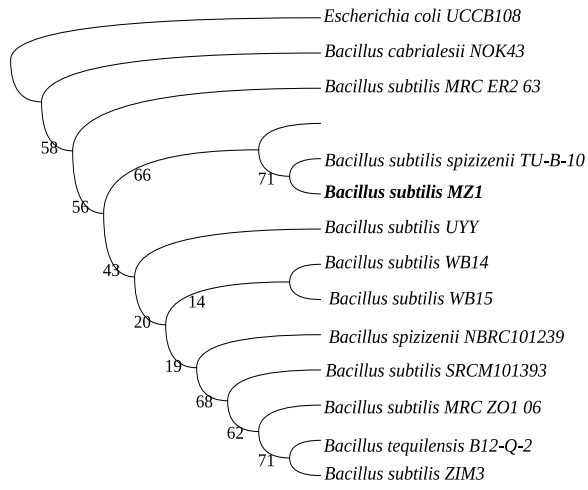


Figure 6. The Maximum likelihood phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA sequences of different *Bacilli* species. The 16S rDNA sequence of the *E. coli* UCCB108 is the outgroup. The accession numbers for the utilized sequences are mentioned beneath the respective genus names.
Figura 6. El árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en base a secuencias de ADNr 16S de diferentes especies de Bacilli. La secuencia de ADNr 16S de *E. coli* UCCB108 es el grupo externo. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se mencionan debajo de los nombres de los géneros respectivos.

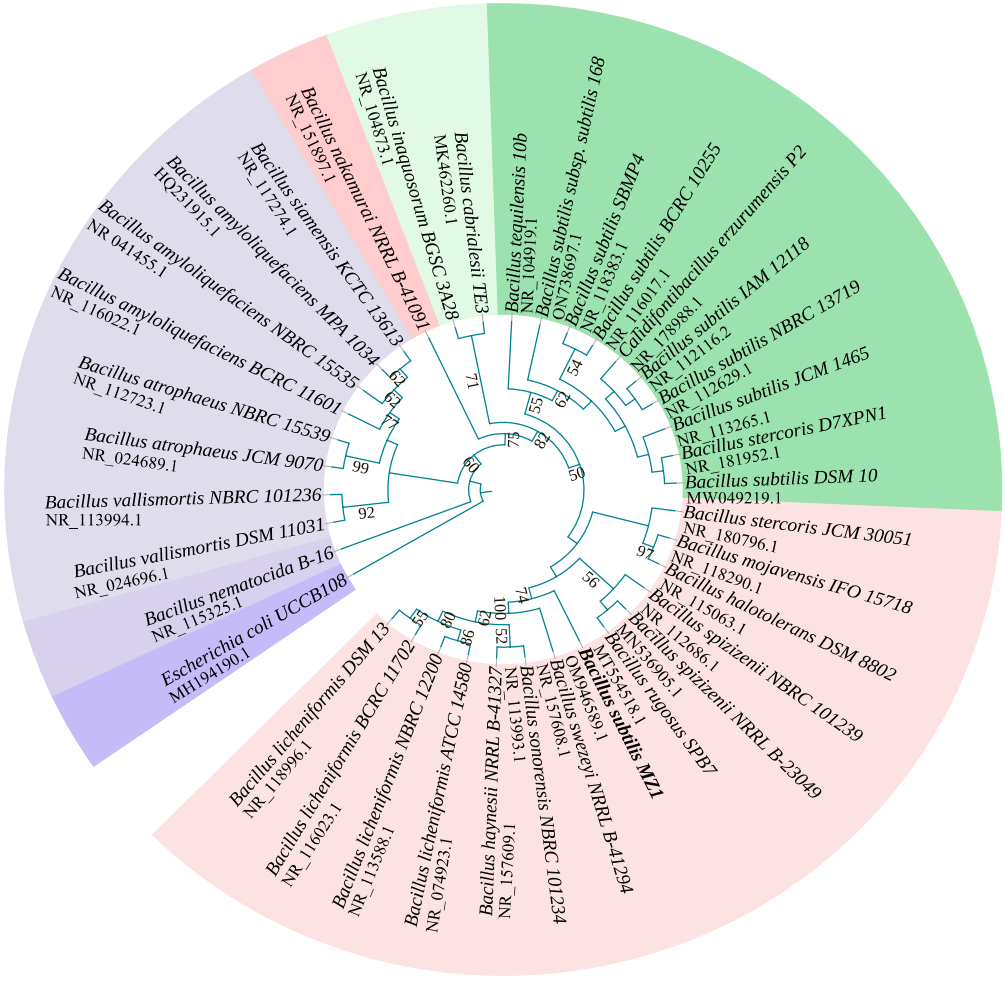


Figure 7. The Maximum likelihood phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of different bacterial strains. The 16S rDNA sequence of the *E. coli* UCCB108 is used as an outgroup. The accession numbers for the utilized sequences are mentioned beneath the respective genus names.
Figura 7. El árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en base a secuencias de ADNr 16S de diferentes cepas bacterianas tipo. La secuencia de ADNr 16S de *E. coli* UCCB108 se utiliza como grupo externo. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se mencionan debajo de los nombres de los géneros respectivos.

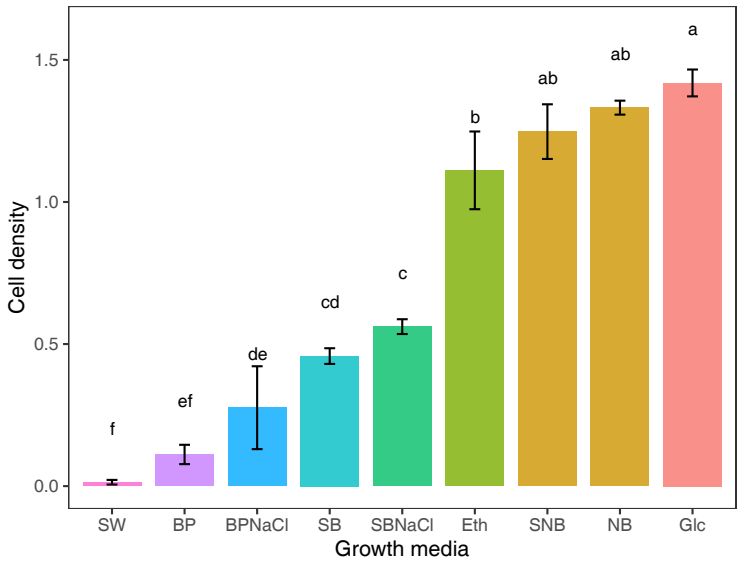


Figure 8. Growth density of *B. subtilis* MZ1 on different growth media. Glc stands for nutrient broth medium where glucose was used instead of the yeast extract; NB nutrient broth; SNB is nutrient broth where seawater was used to dissolve its components; Eth stands for nutrient broth medium where ethanol was used instead of the yeast extract; SBNaCl implicates growth medium that contains only sugarcane bagasse extract dissolved in seawater; SB implicates growth medium that contains only sugarcane bagasse extract; BPNaCl refers to growth medium that encloses only banana peel extract dissolved in seawater; BP denotes to growth medium that has banana peel extract only; and SW implicates seawater only.

Figura 8. La densidad de crecimiento de *B. subtilis* MZ1 en diferentes medios de crecimiento, donde Glc representa el medio de caldo de nutrientes donde se utilizó glucosa en lugar del extracto de levadura; NB caldo de nutrientes; SNB es caldo de nutrientes donde se utilizó agua de mar para disolver sus componentes; Eth representa el medio de caldo de nutrientes donde se utilizó etanol en lugar del extracto de levadura; SBNaCl implica medio de crecimiento que contiene solo extracto de bagazo de caña de azúcar disuelto en agua de mar; SB implica medio de crecimiento que contiene solo extracto de bagazo de caña de azúcar; BPNaCl se refiere a medio de crecimiento que contiene solo extracto de cáscara de plátano disuelto en agua de mar; BP denota medio de crecimiento que tiene solo extracto de cáscara de plátano; y SW implica solo agua de mar.

diverse nitrogen sources had no obvious influence on TTC reduction, as demonstrated in Fig. 9. Surprisingly, glucose, rather than the other sources of carbon, shown a significant impact on enhancing TTC to TPF conversion (Fig. 9).

To test the effect of modifying the growth medium composition on lipid profile, the nutritional growth medium was employed with glucose as an extra carbon source and ammonium sulphate as another nitrogen source at pH 7 and 37 °C. Lipid production of *B. subtilis* MZ1 is mostly rich with caproic acid, when grown on SNB or caprylic acid, when glucose was used as an additional carbon source in the SNB growth medium. From the applied perspectives, *n*-caproic acids are vital in the biodiesel industry, as flavor compounds, and as antimicrobial agents (Zhu *et al.*, 2017). Additionally, the MZ1

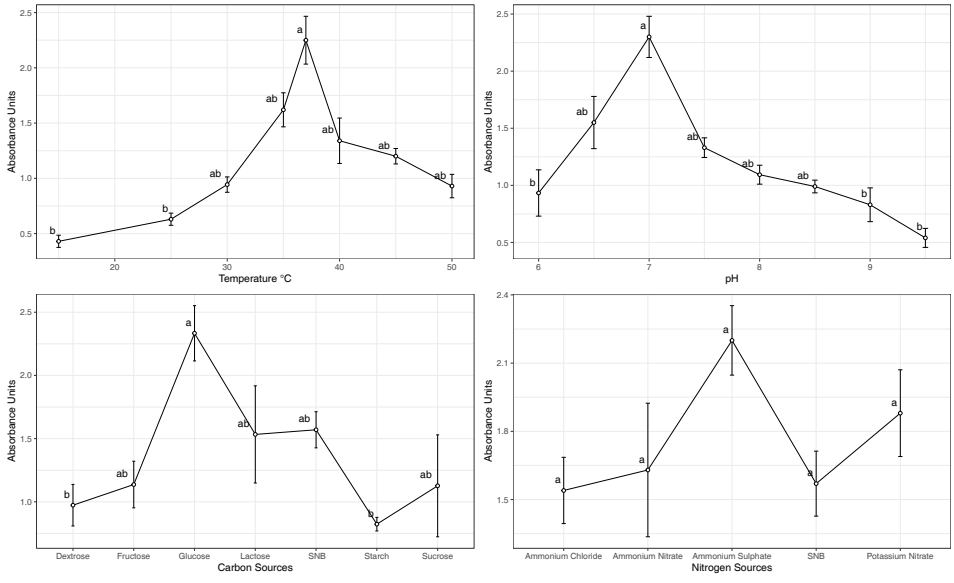


Figure 9. Effect of different temperature, pH points, carbon and nitrogen sources, on *B. subtilis* MZ1 ability to reduce TTC into TPF as expressed by the absorbance of TEF at 450 nm on SNB growth media. Each represented value is the average of three replicas, and each bar shows the standard error among these replicas. The significance among different conditions was measured by Tukey's Honest Significant Difference (Tukey's HSD, $P < 0.05$) using Agricolae-package in R language (R Development Core Team, 2013; De Mendiburu and Simon, 2015). Identical letters indicate that the difference is not statistically significant.

Figure 9. El efecto de diferentes temperaturas, puntos de pH, fuentes de carbono y nitrógeno en la capacidad de *B. subtilis* MZ1 para reducir TTC a TPF, expresado por la absorbancia de TEF a 450 nm en medios de crecimiento SNB. Cada valor representado es el promedio de tres réplicas, y cada barra muestra el error estándar entre estas réplicas. La significancia entre las diferentes condiciones se midió mediante la Prueba de Diferencia Significativa Honestidad de Tukey (Tukey's HSD, $P < 0.05$) utilizando el paquete Agricolae en el lenguaje R (R Development Core Team, 2013; De Mendiburu y Simon, 2015). Las letras idénticas indican que la diferencia no es estadísticamente significativa.

strain produces SFAs such as myristic, pentadecanoic, stearic, besides other MUFAs such as oleic, erucic; and other PUFAs such as cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic, and cis-13,16-docosadienoic in considerable amounts. The results demonstrated that the modified growth medium efficiently changed the *B. subtilis* MZ1 metabolic pathways to create octanoic acid (C8:0, caprylic) instead of hexanoic acid (C6:0, caproic). This metabolic shift suggests that by managing the given feedstock, it is possible to improve carbon chain elongation and produce more valuable longer-chain carboxylic acids (Figs. 4 and 8), and as is shown by the gas chromatograms. We suppose that elongation is the most likely to happen in our case throughout the process of the reverse β-oxidation (Magdalena *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

In sum, this paper reports that the marine *B. subtilis* MZ1 is a good source for *n*-caproic acids production, identified by FAME analysis and 16s rDNA sequencing. Additionally, the results show that the creation of the fatty acids can be maintained by using the seawater-based nutrient broth. Furthermore, manipulating growth media composition controls the profile of the produced fatty acids. For example, using glucose as an additional carbon source enhances the production of caprylic acid rather than caproic acid, because glucose oxidation may add one molecule of Acetyl-CoA to the C6:0, caproic acid. Also, many other PUFAs and MUFAs have been noted to accumulate. This research suggests the *B. subtilis* MZ1 as a competent strain to produce fatty acids, and this finding may help improve biodiesel production or using this microbial strain, as mentioned above, as an energy source for various kinds of applications.

REFERENCES

Atikij, T., Syaputri, Y., Iwahashi, H., Praneenararat, T., Sirisattha, S., Kageyama, H., and Waditee-Sirisattha, R. 2019. Enhanced lipid production and molecular dynamics under salinity stress in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (137C). Marine Drugs, 17 (8), 1-15.

Aziz, A., Siti-Fairuz, M., Abdullah, M.Z., Ma, N.L., and Marziah, M. 2015. Fatty acid profile of salinity tolerant rice genotypes grown on saline soil. Malaysian Applied Biology, 44 (1), 119-124.

Bisen, P.S., Debnath, M., and Prasad, G.B.K.S. 2012. Microbes: Concepts and applications. Microbes: Concepts and Applications. Gwalior, India: Wiley-Blackwell.

Diomandé, S., Nguyen-The, C., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., and Brillard, J. 2015. Role of fatty acids in Bacillus environmental adaptation. Frontiers in Microbiology, 6.

Downes, F.P. and Ito, K., eds. 2001. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. Washington, D.C: American Public Health Association.

El-Halmouch, Y. 2019. Adaptive changes in saturated fatty acids as a resistant mechanism in salt stress in *Halomonas alkaliphila* YHSA35. Egyptian Journal of Botany, 59 (2), 537-549.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of biological chemistry, 226, 497-509.

Gad, A.M., Beltagy, E.A., Abdul-Raouf, U.M., El-Shenawy, M.A., and Abouelkheir, S.S. 2016. Screening of marine fatty acids producing bacteria with antimicrobial capabilities. Chemistry of Advanced Materials, 1 (2), 41-45.

Hegazy, M., Zhou, P., Wu, G., Taloub, N., Zayed, M., Huang, X., and Huang, Y. 2020. Facile synthesis of poly(DMAEMA-co-MPS)-coated porous silica nanocarriers as dual-targeting drug delivery platform: Experimental and biological investigations. Acta Chimica Slovenica, 67 (2), 462-468.

Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., and Vinh, L.S. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. Molecular Biology and Evolution, 35 (2), 518-522.

Hoekman, S.K., Broch, A., Robbins, C., Ceniceros, E., and Natarajan, M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16 (1), 143-169.

Hosono, K., 1992. Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of General Microbiology, 138, 91-96.

Hounslow, E., Kapoore, R., Vaidyanathan, S., Gilmour, D., and Wright, P. 2016. The search for a lipid trigger: The effect of salt stress on the lipid profile of the model microalgal species *Chlamydomonas reinhardtii* for biofuels production. Current Biotechnology, 5 (4), 305-313.

Janßen, H. and Steinbüchel, A. 2014. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. Biotechnology for Biofuels, 7 (1), 7.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermiin, L.S. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Methods, 14 (6), 587-589.

Kan, G., Shi, C., Wang, X., Xie, Q., Wang, M., Wang, X., and Miao, J. 2012. Acclimatory responses to high-salt stress in Chlamydomonas (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. Acta Oceanologica Sinica, 31, 116-124.

Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in Bioinformatics, 20 (4), 1160-1166.

Ke, J., Behal, R.H., Back, S.L., Nikolau, B.J., Wurtele, E.S., and Oliver, D.J. 2000. The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing Arabidopsis seeds. Plant Physiology, 123 (2), 497-508.

Kumar, M., Rathour, R., Gupta, J., Pandey, A., Gnansounou, E., and Thakur, I.S. 2020. Bacterial production of fatty acid and biodiesel: opportunity and challenges. In: Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts. Elsevier, 21-49.

Lee, H., Kim, J.E., Lee, S., and Lee, C.H. 2018. Potential effects of climate change on dengue transmission dynamics in Korea. PLoS ONE, 13 (6).

Lennen, R.M. and Pfleger, B.F. 2013. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. Current Opinion in Biotechnology, 24 (6), 1044-1053.

Letunic, I. and Bork, P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic acids research, 44 (W1), W242-W245.

de los Santos Villalobos, S., Robles, R.I., Parra Cota, F.I., Larsen, J., Lozano, P., and Tiedje, J.M. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69 (12), 3939-3945.

Magdalena, J.A., Ballesteros, M., and González-Fernández, C. 2020. Acidogenesis and chain elongation for bioproduct development. In: J.A. Olivares, D. Puyol, J.A. Melero, and J. Dufour, eds. Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels. Elsevier Science, 391-414.

De Mendiburu, F. and Simon, R. 2015. Agricolae - Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. PeerJ preprints 3:e1404v1.

Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., and Russell, N.J. 1993. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. Journal of General Microbiology, 139, 1877-1884.

NCBI Resource Coordinators. 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research, 44 (Database issue), D7-D19.

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., and Minh, B.Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 32 (1), 268-274.

Oliveira, E.M. de, Sales, V.H.G., Andrade, M.S., Zilli, J.É., Borges, W.L., and de Souza, T.M. 2021. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from Amapaense Amazon soils. International Journal of Microbiology, 2021, 1-11.

Osorio-González, C.S., Hedge, K., K Brar, S., Kermanshahipour, A., and Avalos-Ramírez, A. 2019. Challenges in lipid production from lignocellulosic biomass using *Rhodosporidium* sp.; A look at the role of lignocellulosic inhibitors. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 13 (3), 740-759.

R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rana, Q. ul ain, Laiq Ur Rehman, M., Irfan, M., Ahmed, S., Hasan, F., Shah, A.A., Khan, S., and Badshah, M. 2019. Lipolytic bacterial strains mediated transesterification of non-edible plant oils for generation of high quality biodiesel. Journal of Bioscience and Bioengineering, 127 (5), 609-617.

Ratledge, C. and Lippmeier, C. 2017. Microbial production of fatty acids. In: Fatty Acids. Elsevier Inc, Illinois, US, 237-278.

El Razak, A.A., Ward, A.C., and Glassey, J. 2014. Screening of marine bacterial producers of polyunsaturated fatty acids and optimisation of production. Microbial Ecology, 67 (2), 454-464.

Reimer, L.C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., and Overmann, J. 2022. Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. Nucleic Acids Research, 50 (D1), D741-D746.

Rogers, S.L. and Burns, R.G. 1994. Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations, and seedling emergence, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. Biology and Fertility of Soils, 18, 209-215.

Rohatgi, A. 2019. WebPlotDigitizer [online]. Available from: https://automeris.io/WebPlotDigitizer [Accessed 20 May 2020].

Romano, R., Raddadi, N., and Fava, F. 2020. Mediterranean Sea bacteria as a potential source of long-chain polyunsaturated fatty acids. FEMS Microbiology Letters, 367 (16), 1-8.

Ryan, J., Farr, H., Visnovsky, S., Vyssotski, M., and Visnovsky, G. 2010. A rapid method for the isolation of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria. Journal of Microbiological Methods, 82, 49-53.

Shaaban, M.T., Abdelhamid, R.M., Zayed, M., and Ali, S.M. 2021. Metagenomics technique as new source for antimicrobial agent production. Eco. Env. & Cons., 27, S204-S209.

Shaaban, M.T., Abdelhamid, R.M., Zayed, M., and Ali, S.M. 2022. Evaluation of a new antimicrobial agent production (RSMM C3) by using metagenomics approaches from Egyptian marine biota. Biotechnology Reports, 34, e00706.

Shaaban, M.T., Zayed, M., and Salama, H.S. 2023. Antibacterial potential of bacterial cellulose impregnated with green synthesized silver nanoparticle against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Current Microbiology, 80 (2), 75.

Shulse, C.N. and Allen, E.E. 2011. Diversity and distribution of microbial long-chain fatty acid biosynthetic genes in the marine environment. Environmental Microbiology, 13 (3), 684-695.

Tilay, A. and Annapure, U. 2012. Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria. Biotechnology Research International, 2012:54272, 1-8.

Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P. V, and Reece, J.B. 2017. Campbell biology. 11th ed. New York: Pearson.

Venkata Mohan, S. and Devi, M.P. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. Bioresource Technology, 165, 288-294.

Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., and Egli, T. 2007. Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 µm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities. Environmental Science and Technology, 41 (20), 7080-7086.

Watanabe, K., Ishikawa, C., Yazawa, K., Kondo, K., and Kawaguchi, A. 1996. Fatty acid and lipid composition of an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium. Journal of Marine Biotechnology, 4 (2), 104-112.

Xue, J., Balamurugan, S., Li, D.W., Liu, Y.H., Zeng, H., Wang, L., Yang, W.D., Liu, J.S., and Li, H.Y. 2017. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply. Metabolic Engineering, 41, 212-221.

Zayed, M. and Badawi, M.A. 2020. In-silico evaluation of a new gene from wheat reveals the divergent evolution of the CAP160 homologous genes Into monocots. Journal of Molecular Evolution, 88 (2), 151-163.

Zayed, M., El-Garawani, I.M., El-Sabbagh, S.M., Amr, B., Alsharif, S.M., Tayel, A.A., AlAjmi, M.F., Ibrahim, H.M.S., Shou, Q., Khalifa, S.A.M., El-Seedi, H.R., and Elfeky, N. 2022. Structural diversity, LC-MS-MS analysis and potential biological activities of *Brevibacillus laterosporus* extract. Metabolites, 12 (11), 1102.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, 7 (1–2), 203-214.

Zhu, M., Yu, L.J., Liu, Z., and Xu, H.B. 2004. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. Letters in Applied Microbiology, 39, 332-335.

Zhu, X., Zhou, Y., Wang, Y., Wu, T., Li, X., Li, D., and Tao, Y. 2017. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated Ruminococcaceae bacterium CPB6. Biotechnology for Biofuels, 10, 102.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Standardization of an isothermal test as a novel diagnostic tool in México for the molecular detection of *Chlamydia abortus* in small ruminants

Estandarización de una prueba isotérmica como una nueva herramienta diagnóstica en México para la detección molecular de *Chlamydia abortus* en pequeños rumiantes

Carlos Eduardo Aragón-López[1], Erika Gabriela Palomares-Reséndiz[2], Sergio Cuevas-Tellechea[1], Javier Rolando Reyna-Granados[1], Beatriz Arellano-Reynoso[3], Miguel Angel Sánchez-Castro[1], José Clemente Leyva-Corona[1], Marcela Ivone Morales-Pablos[1]*✉

[1] Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 south. ZC 85130. Obregon City, Sonora, Mexico.
[2] Centro de Investigación Nacional Interdisciplinaria en Salud Animal e Inocuidad of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). ZC 05110, Mexico City.
[3] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). ZC 04510, Mexico City.

ABSTRACT

Ovine Enzootic Abortion (OEA) is caused by *Chlamydia abortus* and has recently been recognized as endemic in Mexico. Due to the impact of OEA on intensive lamb production, it is necessary to establish a sanitary control plan based on an efficient diagnosis. The loop-mediated isothermal amplification technique (LAMP) is a molecular test that can specifically identify *C. abortus*. The aim of this study was to standardize the LAMP technique for the specific detection of *C. abortus* in ovine vaginal exudates. Primers were identified and modified from an electronic database. The effective conditions of the technique were determined using synthetic DNA and positive biological samples by PCR as references. The assay detection limit was 1×10^{-5} of genetic material, equivalent to 8.5 copies. The standardized LAMP test is proposed as a novel molecular tool for the rapid and specific diagnosis of *C. abortus* infection from ovine vaginal exudate samples in Mexico.

Keywords: *Chlamydia abortus*, ompA gene, LAMP, Ovine Enzootic Abortion.

RESUMEN

El Aborto Enzoótico Ovino (AEO) es causado por *Chlamydia abortus* y ha sido reconocido recientemente como endémico en México. Debido al impacto del AEO en la producción intensiva de corderos, es necesario establecer un plan de control sanitario basado en un diagnóstico eficiente. La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una prueba molecular que puede identificar específicamente a *C. abortus*. El objetivo de este estudio fue estandarizar la técnica de LAMP para la detección específica de *C. abortus* a partir de exudado vaginal ovino. Los cebadores fueron identificados y modificados a partir de una base de datos electrónica. Las condiciones efectivas de la técnica se determinaron con ADN sintético y de muestras biológicas positivas por PCR como referencia. El límite de detección de la prueba fue de 1×10^{-5} de material genético, equivalente a 8.5 copias. Se propone el test de LAMP estandarizado como una nueva herramienta molecular para el diagnóstico rápido y específico de la infección por *C. abortus* a partir de muestras de exudado vaginal ovino en México.

Palabras clave: *Chlamydia abortus*, *ompA* gene, LAMP, Aborto Enzótico Ovino.

INTRODUCTION

The most common cause of infectious abortion in sheep flocks is Ovine Enzootic Abortion (OEA), which has significant economic and productivity implications in intensive lamb production. The causative agent is *Chlamydia abortus*, an obligate intracellular gram-negative bacterium (Selim, 2016). Abortive diseases in small ruminants pose a major problem in sheep farming (Benavides Ortíz, 2009), as abortion cases contribute to economic losses due to failed calving (Palomares-Reséndiz *et al*., 2020). Besides being a zoonotic disease, OEA is the most common infectious cause of abortion in sheep worldwide, leading to productivity losses (Selim, 2016). Therefore, OEA is recognized as a constraint to the expansion of the sheep industry and international trade of sheep products (Benavides Ortíz, 2009). The first report of abortive chlamydiosis in small ruminants in Mexico was in 1996, and in 2016, OEA was recognized as an endemic disease (Escalante *et al*., 1996; DOF, 2016). During this time, the disease spread throughout the country due to animal movements for genetic improvement purposes. In 2020, an individual and herd-level seroprevalence of 10.92 % and 43.34 % for *C. abortus*, respectively, was reported in Mexico (Palomares-Reséndiz *et al*., 2020). The background and epidemiological behavior of the disease highlight its relevance in sheep production if it is not controlled in the coming years.

*Author for correspondence: Marcela Ivone Morales-Pablos
e-mail: marcela.morales@itson.edu.mx
Received: July 17, 2023
Accepted: December 5, 2023
Published: December 12, 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2109

To prevent, control, and reduce economic losses from abortive diseases in lamb production, good management practices, as well as early and accurate pathogen detection, are necessary (Yeh *et al*., 2005). As the sheep industry expands, laboratories must be equipped with diagnostic tools to differentiate abortifacient diseases (Benavides-Ortíz, 2009). However, the intracellular lifestyle of *C. abortus* poses challenges for isolation, culture, and identification (Bush and Everett, 2001). Additionally, serological detection in animals is limited by non-specificity caused by cross-reactivity with other *Chlamydia* species (Selim, 2016). Conventional diagnostic methodologies such as cell culture and serology have limitations in early detection for optimal epidemiological disease control. Due to the lack of specificity and low sensitivity of these methods, we are unable to accurately determine the magnitude of the problem.

Molecular assays can discriminate between different bacterial causes of abortions in ewes, even to distinguish among *Chlamydia* species (Reisberg *et al*., 2013). Implementing a more reliable diagnosis in flock biosecurity programs for the sanitary control of *C. abortus* requires the standardization of molecular tests. For instance, Polymerase Chain Reaction (PCR) requires sophisticated and costly tools for amplification and detection of the target DNA (Fakruddin, 2011). PCR is also susceptible to contaminants from different sources, and sample preparation is needed to remove amplification inhibitors (Corless *et al*., 2000).

As an alternative, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a recent molecular method for the identification of microorganisms. This technique is based on the principle of strand displacement activity, allowing amplification of the target DNA using a set of specially designed primers with high specificity and efficiency, even at low concentrations of genetic material (Saharan *et al*., 2014; Hardinge and Murray, 2019). Furthermore, its isothermal feature eliminates the need for expensive thermal cyclers used in PCR, making it a potentially useful and cost-effective method for diagnosing infectious diseases in faraway or vulnerable sectors. In México, sheep production is a system that requires technical advancements to improve efficiency (Hernández-Marin *et al*., 2017), and animal health is essential for sustainability. However, standardizing a molecular diagnostic technique is crucial as factors such as temperature, primer ratio, reaction time, and concentrations of $MgCl_2$, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), and betaine significantly affect the reaction (Ihira *et al*., 2004; Yeh *et al*., 2005). LAMP offers optimization in terms of time and resources required, making it an efficient and cost-effective test for molecular detection of *C. abortus*. Therefore, it is necessary to standardize the conditions for a reliable and feasible LAMP test to ensure specific detection of *C. abortus* from vaginal exudate.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of positive control

For the positive control (CTRL+) design, the primers for *C. abortus* (Chla-LAMP) previously proposed by Lin *et al*. (2011) were selected. The primers (Table 1) were visualized in SnapGene Viewer software and aligned to different sequences of the *ompA* gene that encodes for the *Major Outer Membrane Protein* (*MOMP*), published in different strains of *Chlamydia abortus* (GenBank® accession numbers DQ471955.1, HQ622433.1, EU086705.1, and EF202609.1).

The specificity of the primers was validated *in silico* by the Primer-BLAST (GenBank® software) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. For the CTRL+ synthesis, the DQ471955.1 sequence was downloaded in FASTA format as a result of the alignment using the selected primers. With the SnapGene Viewer visualization software, the generated sequence from the alignment was selected considering 50 base pairs (bp) upstream of the Chla/F3 primer and 50 bp downstream of the Chla/B3 primer from the CTRL+. This sequence and the selected primer set, were synthesized at IDT (Integrated DNA Technologies, USA).

Table 1. Primers for amplification of the *C. abortus* ompA gene**.**
Tabla 1. Cebadores para la amplificación del gen ompA de *C. abortus.*

Primers	Sequences
Chla/F3	ACCTCTAACAGCTGGTACTG
Chla/B3	TGGGTTCCATGTGGTCAAG
Chla/FIP	GAGAGCGCTAAACCAACTTGC-CAACTGACACTAAGTCGGC
Chla/BIP	GGCATAAACTGGTCACGAGCA-ATTTAGGTTGAGCGATGCGG

LAMP reaction standardization

The setting of the LAMP reaction for the detection of the *C. abortus ompA* gene (Chla-LAMP), was carried out with the primer set as described in table 1 in a 25 µL reaction system. The reagent concentrations used were as follows: Chla/F3 and Chla/B3 at 0.1 mM; Chla/FIP and Chla/BIP at 0.8 mM; F2 and B2 at 0.4 mM; 0.2 M betaine; 0.8 mM $MgSO_4$; 0. 2 mM dNTPs; 1 X BST regulator; 0.8 units of BST (2.0 WarmStart DNA Polymerase) enzyme of final concentration, and 10 ng of DNA template were added at the end of the reaction mixture. Afterward, the temperature and time conditions were standardized and determined in a mini incubator (Bio-Rad™) at 62 °C for 30 to 60 m. The visualization of amplified products was analyzed by electrophoresis (1.5 % agarose gel) through visual observation using ethidium bromide (Sigma Aldrich®). Once the results were satisfactory, the protocol was validated in triplicate.

To corroborate the standardization from CTRL+, Chla-LAMP was tested with five DNA samples previously confirmed by PCR as positive for *C. abortus*. The positive samples were provided by the Centro de Investigación Nacional Interdisciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID) of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in Mexico City.

Assay for the analytical sensitivity

From the Chla-LAMP standardization results the analytical sensitivity assay was assessed subjecting the CTRL+ to diffe-

rent gradients of the concentration. Six 1:9 serial dilutions of CTRL+ (5 to 10 e^{-7} ng/µL dilution) were performed to determine the assay's limit of detection.

Detection of *C. abortus* in biological samples

Sampling of the experimental population

In a commercial flock with a history of abortions and suggestive signs to *C. abortus* (Eg. tearing, weak in offspring, stillbirths, placentitis) located in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico, 48 ewes (>12 months) were randomly selected. A sterile swab was introduced into the vagina of each ewe and with circular movement the vaginal wall was rubbed to obtain the maximum quantity of exudate. Then, the swab was placed into 1.5 mL vials with phosphate-buffered saline and shipped at 5 °C to the laboratory.

During sampling, the animals' integrity was not compromised at any time and this procedure was approved by an ethics committee in accordance with the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999.

DNA extraction

The samples were first homogenized by agitation and inversion. Afterward, the DNA extractions were carried out by the taco™ Nucleic Acid Automatic Extraction System (GeneReach Biotechnology Corp.) using the taco™ DNA/RNA Extraction Kit according to the manufacturer's method. The final extracted product of nucleic acids was quantified and counted with UV spectrophotometry (BioSpect-Nano, Shimadzu®). The integrity of the extracted DNA was verified by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide. All the extractions were stored in 1.5 mL sterile vials at -20 °C to be subsequently processed for the Chla-LAMP technique.

Detection of *C. abortus* in biological samples

Once the genetic material was extracted, *C. abortus* detection was performed following the Chla-LAMP protocol as previously described in the standardization section. The products were visually detected by electrophoresis in 1.5 % agarose gel using a load buffer (Blue-orange®, Promega) and ethidium bromide.

RESULTS

Positive control synthesis

The product of the CTRL+ synthesis yielded a sequence of 316 bp corresponding to a fragment of the *ompA* gene that codifies for the MOMP protein of *C. abortus*, and was positioned between the 687 and 938 nucleotides from the start codon of the reading frame of the gene (Figure 1). The CTRL+ had 100 % of homology to the sequence reported in NCBI GenBank® and was recognized with the identifier DQ471955.1.

Chla-LAMP standardization

The LAMP assay to detect *C. abortus* with the primers that recognize the targeted *ompA* gene displayed conditions of optimal amplification. The reaction was visualized after 30 minutes, but for better visualization in agarose gel, it was determined at 40 min (Figure 2). The amplification products were observed on agarose gels in different sizes, which are distinctive for LAMP assays (Figure 3).



Figure 1. Diagram of primers and their alignment in specific *C. abortus* ompA sequence.
Figura 1. Diagrama de cebadores y su alineación en secuencia específica de *C. abortus* ompA.

Fuchsia-coloured arrows indicate the direction and site recognized by the primers in the sequence of the synthetic positive control (CTRL+) and the name. The letters in fuchsia indicate the name of the primers.

Analytical sensitivity

The limit of detection in the Chla-LAMP assay was 5×10^{-5} ng of the synthesized genetic material (Figure 4). The amount of acid nucleic represented 8.5 genomes equivalent to 30,893 copies of the sequence (316 bp of an *ompA* gene fragment) that codifies for the MOMP protein of *C. abortus*.

Detection of *C. abortus* in biological samples

The Chla-LAMP reaction to detect *C. abortus* DNA from vaginal swabs was carried out under optimal conditions. The best reaction was achieved at 62 °C for 40 min, which detected 81.25 % (39/48) of the animals with the presence of genomic material of *C. abortus* (Figure 5).

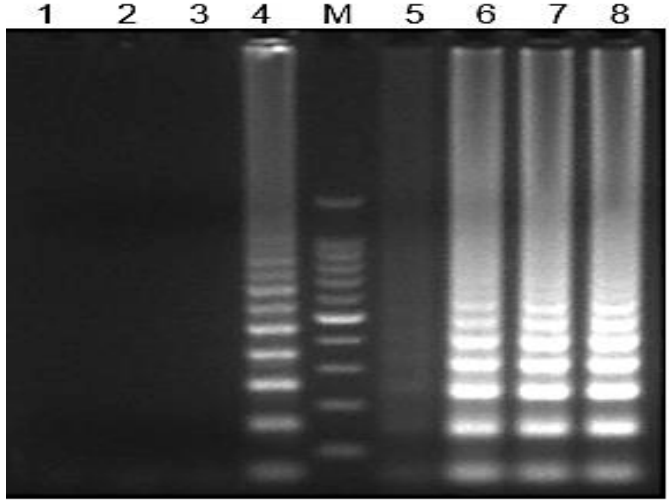


Figure 2. Visualization of LAMP assay for *C. abortus* detection using ompA gene primers at different amplification timepoints.
Figura 2. Visualización del ensayo LAMP para la detección de *C. abortus* utilizando cebadores del gen ompA en diferentes momentos de amplificación.

Tracks 1= negative control at 30 min, 2 = negative control at 40 min, 3 = negative control at 50 min; negative control at 4 = 60 min, M = kb molecular marker 1 kb, 5 = CTRL+ at 30 min, 6 = CTRL+ at 40 min, 7 = CTRL+ at 50 min, and 8= CTRL+ at 60 min.

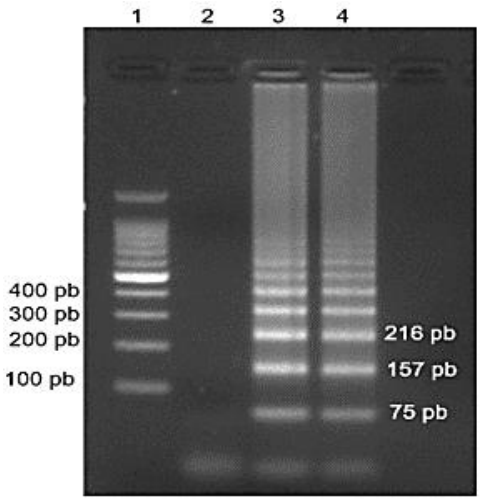


Figure 3. Agarose gel with LAMP product for the amplification of the synthetic DNA and ompA gene.
Figura 3. Gel de agarosa con producto LAMP para la amplificación del ADN sintético y gen ompA.

Tracks 1 = 1 kb molecular marker; 2 = Negative control; 3 = Positive control (CTRL+); 4 = Biological sample of *C. abortus.*

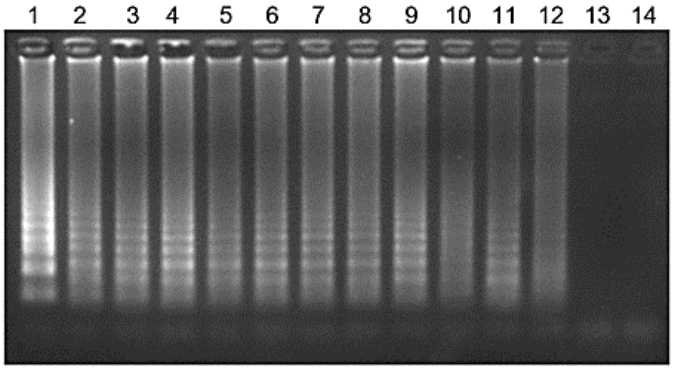


Figure 4. Sensitivity analysis of Chla-LAMP assay by DNA concentration gradient.
Figura 4. Análisis de sensibilidad del ensayo Chla-LAMP por gradiente de concentración de ADN.

DNA concentration in tracks from 1 to 13 = 5.00E00, 1.00E00, 5.00E-01, 1.00E-01, 5.00E-02, 1.00E-02, 5.00E-03, 1.00E-03, 5.00E-04, 1.00E-04, 5.00E-05, 1.00E-05 and 5.00E-06 ng/µL respectively. Track 14 = negative control.

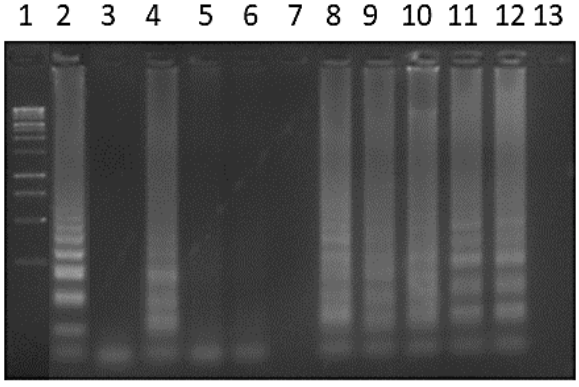


Figure 5. Chla-LAMP amplification of *C. abortus* DNA from vaginal samples.
Figura 5. Amplificación de Chla-LAMP de ADN de *C. abortus* de muestras vaginales.
Tracks 1= 1 kb molecular marker, 2= CTRL+, 3= negative control; from 4 to 13= LAMP product with biological samples.

DISCUSSION

The multiple alignment sequences of the Chla-LAMP external primers (F3/Chla and B3/Chla) in the Primer-BLAST tool, exhibited high *in silico* homology with sequences matching *Chlamydia abortus*. A lower homology was observed for *Chlamydia psittaci*, an isolated pathogen in poultry and other birds (Li *et al*., 2016). No homology was identified with other organisms, ensuring that the primers in the current assay specifically target *C. abortus* DNA. The *ompA* gene sequence chosen as the target in this study can discriminate serotypes, species, and antigens specific to the genus and species within the Chlamydiaceae family (Conlan *et al*., 1988; Salti-Montesanto *et al*., 1997). Primers designed from pmp genes are reported to improve the molecular diagnosis of *Chlamydias* in sheep (Laroucau *et al*., 2001). However, these genes exhibit short-term variability (Read *et al*., 2003), leading to the hypothesis that primers designed from these sequences may require recurrent updates compared to *ompA* genes. In contrast, *the ompA* gene has nearly 100 % conservation of its *ompA* sequences (Everett *et al*., 1999), suggesting that these primers will be more durable and enable the discovery of new strains of *C. abortus*.

Additionally, like the *ompA* primers, the designed primers for *C. abortus pmp* genes are also proposed as a tool for the detection of *C. psittaci* (Laroucau *et al*., 2007). However, it should be noted that the use of *ompA* primers may indicate a lack of specificity for *C. abortus*. Even with nucleotide alignment search tools, the Chla-LAMP primers showed alignment with both organisms. Therefore, it is recommended to explore alternative sequences or molecular markers that can provide better specificity for identifying *C. abortus*. This can help ensure accurate and reliable detection of *C. abortus* without potential cross-reactivity with other *Chlamydias*.

The use of synthetic sequences as positive controls is crucial for the detection of microorganisms. This allows for standardization, and the determination of detection limits in diagnostic panels, ensuring accurate detection and minimizing false negative results. Recently, the use of synthetic fragments has been reported for the detection of zoonotic bacteria such as *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Legionella pneumophila* (Cardenas, 2018). Also, synthetic sequences have been used as standards in the multiplex PCR detection of *Taenia spp*. (Ng-Nguyen *et al*., 2017) and for the molecular identification of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Rickettsia rickettsii* (Aragón-López *et al*., 2021). Therefore, the use of synthesized positive sequences in the standardization of molecular assays enhances the efficiency of bioassays for detection, especially when biological isolates are not readily available.

During the standardization of the Chla-LAMP assay, the reaction was visualized on agarose gels within the first 30 min. However, at 40 min the visualization became sharper and more stable. Reactions longer than 60 m sometimes result in false positives due to the impact of template concentration on amplification time. Additionally, prolonged reactions with low-purity primers may also yield false positives

(Hardinge and Murray, 2019). Therefore, it is recommended to work with a positive synthetic control to minimize template concentration variations.

In another study comparing LAMP with conventional nested PCR for *Chlamydia* detection and chick embryo isolation, the assay exhibited the same sensitivity with a limit of detection of 4 genomic copies and higher to the chick embryo isolation (Lin *et al*., 2011). Other analyses reported sensitivity limits of up to 10 and 25 genomes per reaction (Halse *et al*., 2006; Appelt *et al*., 2019). However, Chla-LAMP demonstrated equal or better sensitivity compared to Ashraf *et al*. (2018), who reported detection limits of $1e^{-04}$ and $1e^{-05}$ ng of genetic material from pure cultures and DNA extractions from milk samples, respectively.

CONCLUSIONS

A LAMP assay was standardized for the fast and accurate detection of the *ompA* gene of *C. abortus*. This test was successfully validated, using DNA extracted from the vaginal exudate of ewes from flocks with a history of *C. abortus*-induced abortions, and confirmed by PCR. The standardized Chla-LAMP assay demonstrated specificity, sensitivity, and accuracy in detecting *Chlamydia abortus* in infected sheep, with no risk of cross-contamination with other *Chlamydia*s. LAMP is considered a novel methodology that could be valuable for biosecurity protocols in intensive lamb production.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express great gratitude to all sheep producers in Sonora, Mexico for their trust and support over the past years.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors of this study declare no conflict of interest.

DECLARATION

For the ethical standards and statement of animal rights in this study, the Research Committee of the Department of Agronomic and Veterinary Sciences of the Instituto Tecnologico de Sonora approved the procedures used in this study, which were in accordance with the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 for the production, care, and use of experimental animals.

REFERENCES

Appelt, S., Aly, S. S., Tonooka, K., Glenn, K., Xue, Z., Lehenbauer, T. W., and Marco, M. L. 2019. Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Journal of Dairy Science, 102(3), 1985-1996. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15306

Aragón-López, C., Luna-Nevárez, P., Ortiz-Encinas, V., Leyva-Corona, J., Cantú-Soto, E., and Reyna-Granados, J. 2021. Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* en caninos domésticos del municipio de Cajeme, Sonora, México. Abanico Veterinario, 11. http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.45

Ashraf, A., Imran, M., Yaqub, T., Tayyab, M., Shehzad, W., Mingala, C. N., and Chang, Y. F. 2018. Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis* in mastitic milk. Folia Microbiologica, 63(3), 373-380. https://doi.org/10.1007/s12223-017-0576-x

Benavides-Ortíz, E. 2009. Principales enfermedades que afectan la producción ovina en el trópico. Spei Domus, 5(11), 32-36. Recovered from de https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/594

Bush, R. M., and Everett, K. D. E. 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(1), 203-220. https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-203

Cardenas, Y. 2018. Determinación de la contaminación microbiológica del agua de riego aplicando nuevas estrategias de análisis (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona. España. http://hdl.handle.net/10803/586307

Conlan, J. W., Clarke, I. N., and Ward, M. E. 1988. Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Molecular Microbiology, 2(5), 673-679. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1988.TB00076.X

Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, E. B., and Fox, A. J. 2000. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16s rRNA PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38(5), 1747-1752. https://doi.org/10.1128/jcm.38.5.1747-1752.2000

Diario Oficial de la Federación 2016. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. SEGOB. México. Recovered from: http://www.dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5436016

Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F., and Romero-Martínez, J. 1996. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 38(1), 17-23. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8783901/

Everett, K. D. E., Bush, R. M., and Andersen, A. A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. International Journal of Systematic Bacteriology, 49(2), 415-440. https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-415

Fakruddin, M. D. 2011. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)–an alternative to polymerase chain reaction (PCR). Bangladesh Research Publications Journal, 5(4). http://www.bdresearchpublications.com/admin/journal/upload/09235/09235.pdf

Halse, T. A., Musser, K. A., and Limberger, R. J. 2006. A multiplexed real-time PCR assay for rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and identification of serovar L-2, the major cause of Lymphogranuloma venereum in New York. Molecular and

Cellular Probes, 20(5), 290-297. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.02.003

Hardinge, P., and Murray, J. A. H. 2019. Reduced false positives and improved reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. Scientific Reports, 9(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z

Hernández-Marin, J. A., Valencia-Posadas, M., Ruíz-Nieto, J. E., Mireles-Arriaga, A. I., Cortez-Romero, C., and Gallegos-Sánchez, J. 2017. Contribution of sheep breeding to the livestock sector in Mexico. Agroproductividad, 10(3), 87–93. https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/975?source=/index.php/agroproductividad/article/view/975#:~:text=https%3A//revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/975

Ihira, M., Yoshikawa, T., Enomoto, Y., Akimoto, S., Ohashi, M., Suga, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Nishiyama, Y., Notomi, T., Ohta, Y., and Asano, Y. 2004. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, Loop-Mediated Isothermal Amplification. Journal of Clinical Microbiology, 42(1), 140-145. https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.140-145.2004

Laroucau, K., Souriau, A., and Rodolakis, A. 2001. Improved sensitivity of PCR for Chlamydophila using pmp genes. Veterinary Microbiology, 82(2), 155-164. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00381-9

Laroucau, K., Trichereau, A., Vorimore, F., and Mahé, A. M. 2007. A pmp genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. Veterinary Microbiology, 121(1–2), 150-157. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.013

Li, J., Guo, W., Kaltenboeck, B., Sachse, K., Yang, Y., Lu, G., Zhang, J., Luan, L., You, J., Huang, K., Qiu, H., Wang, Y., Li, M., Yang, Z., and Wang, C. 2016. *Chlamydia pecorum* is the endemic intestinal species in cattle while *C. gallinacea*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae* associate with sporadic systemic infection. Veterinary Microbiology, 193, 93-99. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.008

Lin, G.-Z., Zheng, F.-Y., Zhou, J.-Z., Wang, G.-H., Cao, X.-A., Gong, X.-W., and Qiu, C.-Q. 2011. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay targeting the MOMP gene for rapid detection of *Chlamydia psittaci abortus* strain. Pakistan Veterinary Journal, 32(2), 273-276: https://www.researchgate.net/publication/267803405

NG-Nguyen, D., Stevenson, M. A., Dorny, P., Gabriël, S., Vo, T. V., Nguyen, V-A. T., Phan, T. V., Hii, S. F., and Traub, R. J. 2017. Comparison of a new multiplex real-time PCR withthe Kato Katzthick smear and copro-antigen ELISA for the detection and differentiation of *Taenia* spp. in human stools. PLoS Neglected Tropical Diseases. 11(7):e0005743. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005743

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12), e63. https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBgkqhkiG9w0BBwagggJTMIICTwIBADCCAkgGCSqGSIb3DQEHA-TAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVuIAgEQgIICGSfU5ehJRqbIy2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4l

Palomares-Reséndiz, E. G., Mejía-Sánchez, P., Aguilar-Romero, F., De la Cruz-Colín, L., Jimé-nez-Severiano, H., Leyva-Corona, J. C., Morales-Pablos, M. I., and Díaz-Aparicio, E. 2020. Frecuencia y factores de riesgo asociados a la presencia de Chlamydia abortus, en rebaños ovinos en México. Re-vista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 11(3), 783-794. https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5269

Read T. D., G. S. A. Myers, R. C. Brunham, W. C. Nelson, I. T. Paulsen, J. Heidelberg, E. Holtzapple, H. Khouri, N. B. Federova, H. A. Carty, L. A. Umayam, D. H. Haft, J. Peterson, M. J. Beanan, O. White, S. L. Salzberg, R. C. Hsia, G. McClarty, R. G. Rank, Bavoil P. M., and Fraser C. M. 2003. Genome sequence of Chlamydophila caviae (Chlamydia psittaci GPIC): Examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. Nucleic Acids Research, 31(8), 2134-2147. https://doi.org/10.1093/nar/gkg321

Reisberg, K., Selim, A. M., and Gaede, W. 2013. Simultaneous detection of Chlamydia spp., Coxiella burnetii, and Neospora caninum in abortion material of ruminants by multiplex real-time polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25(5), 614-619. https://doi.org/10.1177/1040638713497483

Salti-Montesanto V, Tsoli E, Papavassiliou P, Psarrou E, Markey BK, Jones GE, and Vretou E. 1997. Di-agnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of Chlamydia psittaci serotype 1. American Journal of Veterinary Research, 58(3):228-235. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9055966/

Saharan, P., Dhingolia, S., Khatri, P., Singh Duhan, J., and Kumar Gahlawat, S. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. African Journal of Biotech-nology, 13(19), 1920-1928. https://doi.org/10.5897/ajb2013.13459

Selim, A. 2016. Chlamydophila abortus infection in small ruminants: A review. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 11(10), 587-593. https://doi.org/10.3923/ajava.2016.587.593

Yeh, H. Y., Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H. 2005. Evaluation of a loop-mediated isothermal ampli-fication method for rapid detection of channel catfish Ictalurus punctatus important bacterial pathogen Edwardsiella ictaluri. Journal of Microbiological Methods, 63(1), 36-44. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.015

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Aislamiento de bacterias nativas con potencial en la promoción del crecimiento de maíz criollo mexicano (*Zea mays* L.)

Isolation of native bacteria with mexican native maize (*Zea mays* L.) growth promoting potential

Monica Guadalupe Sánchez-Ceja[1], Pedro Damián Loeza-Lara[1], Santos Carballar-Hernández[1], Rafael Jiménez-Mejía[1], Ricardo Ivan Medina-Estrada[1]*✉

[1] Licenciatura en Genómica Alimentaria, Av. Universidad # 3000. Lomas de La Universidad, C.P: 59103. Sahuayo, Michoacán, México.

RESUMEN

El maíz criollo (*Zea mays* L.) es un alimento emblemático para México, ya que representa un factor importante en cuanto a economía local, cultura y biodiversidad. Las técnicas biotecnológicas donde se emplean bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), son una alternativa sostenible al uso de insumos agrícolas químicos para la producción de maíz, sin embargo, es importante destacar que, lo ideal es utilizar BPCV nativas del suelo y/o cultivo donde se pretendan aplicar, ya que esto asegura la adaptación de las BPCV y garantiza la colonización de la rizosfera, mejorando los rendimientos productivos del cultivo. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo, fue aislar bacterias nativas de suelos cultivados con maíz criollo mexicano y demostrar su potencial biotecnológico como BPCV en maíz. Se tomaron muestras de suelo cultivado con maíz criollo mexicano, del municipio de Jiquilpan, Michoacán, México y se lograron obtener 40 asilados, de los cuales 18 indujeron la germinación de las semillas de maíz en más del 90 %. Además, cuatro aislados mostraron incrementos del 20 al 30 % en la longitud total del brote y aumentos del 25 hasta el 100 % en el peso seco total de las plantas. Los mecanismos asociados a la promoción del crecimiento del maíz fueron los de, solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético y de sideróforos, así como el antagonismo contra hongos fitopatógenos (*Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Colletotrichum*). Por lo cual, concluimos que las BPCV nativas aisladas en el presente estudio, tienen potencial biotecnológico para su uso en maíz criollo mexicano de la región.

Palabras clave: Producción de maíz; Rizobacterias nativas; Biotecnología microbiana.

ABSTRACT

Mexican native maize (*Zea mays* L.) is an emblematic food for Mexico, as it represents an important factor in terms of local economy, culture and biodiversity. Biotechnological techniques using plant growth-promoting bacteria (PGPB) are a sustainable alternative to the use of chemical agricultural inputs for corn production; however, it is important to emphasize that the ideal is to use native PGPB into the soil and/or crop where they are to be applied, since this ensures the PGPB adaptation and guarantees the colonization of the rhizosphere, improving crop yields. Therefore, the objective of the present work was to isolate native bacteria from soils cultivated with Mexican native maize and to demonstrate their biotechnological potential as PGPB in corn. Soil samples were taken from the municipality of Jiquilpan, Michoacán, Mexico and 40 isolates were obtained, of which 18 showed more than 90% germination of maize seeds. In addition, four isolates showed increases of 20 to 30 % in total shoot length and increases of 25 to 100 % in total plant dry weight. The mechanisms associated with maize growth promotion were phosphate solubilization, indole acetic acid and siderophore production, as well as antagonism against phytopathogenic fungi (*Penicillium, Rhizopus, Fusarium* and *Colletotrichum*). Therefore, we conclude that the native PGPB isolated in the present study have biotechnological potential for use in Mexican native maize in the region.

Keywords: Maize production; Native rizobacteria; Microbial biotechnology.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes en el mundo, ya que representa el 38.1 % de la producción total de los granos (Imade y Babalola, 2021). México ocupa el 4° lugar en producción de maíz a nivel mundial, siendo este grano un insumo fundamental para la industria agroalimentaria en el país. Aunado a ello, en México se han registrado entre 59 y 62 variedades de maíz (de las aproximadamente 300 reportadas en América Latina), por tal motivo, desde el 2012 se denominó a México como centro de origen y diversidad genética del maíz (Diario Oficial de la Federación, 2012; García *et al.*, 2018).

En los últimos 40 años, la capacidad de producción de maíz se ha incrementado debido al desarrollo e implementación de tecnologías y al incremento de tierras destinadas para cultivo, ya que las necesidades de abastecimiento, paralelamente fueron en aumento a causa del crecimiento exponencial de la población y constante demanda de granos por parte del sector pecuario, siendo este último el mayor demandante de maíz (Ranum *et al.*, 2014; Molina, 2021). El proceso de tecnificación se reflejó en el establecimiento de monocultivos de maíz y el uso indiscriminado de insumos químicos sintéticos, acelerando la degradación de los suelos

*Autor para correspondencia: Ricardo Ivan Medina-Estrada
Correo electrónico: rimedina@ucemich.edu.mx
Recibido: 08 de agosto de 2023
Aceptado: 13 de diciembre de 2023
Publicado: 14 de diciembre de 2023

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2125

ocasionando la perturbación de la rizosfera. Los monocultivos propician la susceptibilidad de la planta a plagas y enfermedades y merman su crecimiento y desarrollo (Tofiño Rivera *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021; Korenblum *et al.*, 2022). Lo anterior, ha influido en el incremento de los costos de producción, impactando severamente en la economía de los productores (Olanrewaju y Babalola, 2019; Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

Este escenario ha propiciado la búsqueda de estrategias que permitan incrementar la producción del maíz a bajo costo y con menor impacto ambiental (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). Una alternativa para lograrlo, ha sido la aplicación de microorganismos nativos benéficos, como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), las cuales tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos como, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de minerales, producción de compuestos reguladores del crecimiento y de la inmunidad de las plantas, además de presentar actividad antagónica contra hongos y bacterias fitopatógenas (Vejan *et al*., 2016; Haskett *et al*., 2021). Las BPCV aplicadas como biofertilizantes pueden suplir, en cierta proporción, el uso de fertilizantes químicos esenciales para el maíz, por lo que prometen ser una estrategia sustentable para abastecer la demanda mundial de granos (Grageda-Cabrera *et al*., 2012; Higdon *et al*., 2020; Haskett *et al*., 2021; Al-Tammar y Khalifa, 2022).

En función de su lugar de aislamiento, podemos clasificar a las BPCV en dos grandes grupos, las bacterias exógenas, es decir, microorganismos aislados de suelos o plantas diferentes a los que posteriormente son aplicados de manera experimental o a nivel comercial; y las BPCV nativas, es decir, las que se aíslan del mismo suelo o planta en la que se aplican. Estas BPCV nativas, presentan mejores respuestas de adaptación y de colonización de la rizosfera, ya que presentan los mecanismos de adaptación particulares a las condiciones bióticas y abióticas del lugar (García *et al*., 2017; Pérez-Rodriguez *et al*., 2020; Amezquita-Aviles *et al*., 2021). Al respecto, se ha descrito que las BPCV nativas, se asocian con las raíces de las plantas y con otros microorganismos, como los hongos micorrizicos arbusculares, lo cual propicia una simbiosis que resulta exitosa para todos los involucrados y se logra un efecto positivo a largo plazo, ya que se logra la prevención y/o recuperación gradual de suelos degradados (Schlemper *et al*., 2018; Armanda *et al*., 2018; Thiergart *et al.*, 2019). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue asilar BPCV nativas de suelos de la región Ciénega de Michoacán, México, que sean efectivas en la promoción del crecimiento del maíz criollo mexicano (*Zea mays* L).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

El muestreo se realizó en la comunidad de Abadiano, municipio de Jiquilpan, Michoacán, México. Sus coordenadas son Longitud: -102.872500 y Latitud: 19.991667, a una altura de 2,140 msnm. Esta localidad forma parte de una zona de transición, ya que termina la selva baja caducifolia y comienza el bosque de pino y encino. En el área de estudio predomina la siembra de maíz criollo de temporal, donde principalmente se utiliza la raza Celaya (Wellhausen, *et al*., 1951), además, predominan las prácticas agrícolas convencionales (poca tecnificación del campo). La obtención de muestras se realizó durante la primavera (abril de 2020), en una parcela (Longitud -102.869117 y Latitud 20.016680) donde se siembra maíz de temporal y también se usa como potrero de pastoreo para ganado bovino. Con una barrena para muestreo de suelos de 2.5 cm de diámetro, se tomaron 5 muestras simples superficiales al azar (0 a 20 cm de profundidad) y se mezclaron para obtener una muestra compuesta. La muestra compuesta se llevó al Laboratorio de Biotecnología de la Licenciatura en Genómica Alimentaria (LGA) de la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH), para realizar el aislamiento y los ensayos respectivos. El análisis de suelo se realizó en el Departamento de Suelos del Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma de Chapingo (Tabla 1).

Obtención de aislados bacterianos

Para el procesamiento de las muestras en el laboratorio, se tomaron 10 g de suelo y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril (1, 0.1 y 0.01). Se inocularon 200 µL de cada dilución por duplicado en cajas Petri (100 mm) con agar Luria Bertani (LB- 15 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico). Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 h (Mau *et al.*, 2011). Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron las cajas en donde hubo crecimiento bacteriano y se procedió a realizar la purificación de los aislados con base en sus características macroscópicas (tamaño, forma, borde, elevación, textura y color). Estos aislados se subcultivaron con palillos de dientes estériles, tomando una colonia y estriándola en una caja Petri (100 mm) con agar LB. Finalmente, se purificaron 40 asilados, a los cuales se les realizó la tinción de Gram (Casasola-Bado, 2022) y se les asignó un código de identificación. Finalmente, se criopreservaron en glicerol a - 20 °C, para integrarlos al ceparío del Laboratorio de Biotecnología-LGA-UCEMICH.

Ensayos de germinación y vigor *in vitro*

Se utilizaron semillas de maíz criollo mexicano, las cuales fueron donadas por el productor y dueño de la parcela muestreada y corresponden al ciclo de producción anterior (2019) que resguarda en bodega para utilizar en el ciclo

Tabla 1. Análisis de suelo.
Table 1. Soil analysis.

pH	C.E. (dS m^{-1})	M.O. (%)	N (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
7.15	0.2	4.03	17.5	22.13	26.9	35.3	37.8	Franco-Arcilloso

de producción siguiente. Las semillas se esterilizaron en campana de flujo laminar utilizando cloro al 3 % (5 min), etanol al 70 % (5 min) y agua destilada estéril (tres lavados de 30 s c/u); se dejaron secar y, posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas de germinación siguiendo la metodología reportada por Guillen-de la Cruz *et al*. (2018), con algunas modificaciones. Se colocaron 5 semillas por caja Petri (100 mm) con agar-agar (0.9 %) y se adicionaron 20 µL, sobre cada semilla, del aislado previamente crecido a 37 °C en agitación a 1,200 rpm durante 18 h y a una concentración final de $1x10^6$ UFC/mL. Las cajas se incubaron a 28 °C y se mantuvieron en oscuridad durante 5 días. Para este ensayo se inocularon un total de 15 semillas por aislado (40 asilados) y se estableció un control de semillas sin inoculación, solamente colocadas en agar-agar. Para obtener el porcentaje de germinación, se aplicó la ecuación 1.

$$G = \frac{\text{total de semillas germinadas}}{\text{total de semillas}}\ x\ 100.$$

Ecuación 1. Porcentaje de germinación (Guillen-de la Cruz *et al*., 2018).

Como un primer indicador de promoción del crecimiento vegetal (Constantino *et al*., 2011), se seleccionaron los aislados que, pasado el tiempo de incubación, indujeron un porcentaje de germinación ≥ al 90 %, quedándonos con 18 de los 40 aislados. Para la evaluación de vigor, se procedió a realizar la misma metodología que para los ensayos de germinación, con la diferencia en el periodo de incubación, que se llevó hasta los 8 días. Las variables evaluadas para vigor fueron longitud del brote y de la raíz (incluido el tamaño total) y, peso seco del brote y de la raíz (incluido el peso total). Para estos ensayos, se estableció un diseño experimental completamente al azar con 19 condiciones (18 aislados y un control de semillas sin inoculación solamente colocada en agar-agar) y 15 repeticiones, para un total de 285 unidades experimentales.

Pruebas *in vivo* sobre la promoción del crecimiento en maíz criollo mexicano

Para las pruebas *in vivo*, se utilizó la metodología reportada por Parra-Cota *et al*. (2014) con modificaciones. Se utilizaron macetas de plástico de 0.25 L, con suelo proveniente de la zona de muestreo, previamente esterilizado (Análisis de suelo en Tabla 1), donde se sembraron tres semillas de maíz criollo por maceta (previamente desinfectadas) y se adicionó el inóculo bacteriano ajustado a una concentración final de $1x10^6$ UFC/mL. Las plantas se mantuvieron con riego (agua corriente) cada tercer día. Para estos ensayos, se estableció un diseño experimental completamente al azar con 19 condiciones (18 aislados y un control de semillas sin inoculación) y 12 repeticiones, para un total de 228 unidades experimentales. Después de 14 d se evaluaron los parámetros de longitud foliar, longitud de raíz primaria, así como el peso seco foliar y de la raíz.

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Se realizaron distintos ensayos para determinar los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal más comunes, tanto directos como indirectos. Es importante destacar, que estos ensayos se realizaron solamente en los asilados que mostraron un porcentaje de germinación ≥ al 90 % sobre las semillas de maíz criollo mexicano.

Producción de ácido indolacético (AIA)

Para determinar la producción de AIA (una auxina) en los aislados, se usó el método colorimétrico reportado por Sachdev *et al*. (2009). Primero, se realizó una curva de calibración a partir de una solución de AIA (Sigma®) (0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm), y se mezcló con el reactivo de Salkowski (150 mL de H_2SO_4, 250 mL de H_2O destilada y 7.5 mL de $FeCl_3$ 0.5 M), el cual permite la oxidación de compuestos indólicos, produciendo una coloración rosa cuando la respuesta es positiva. Por otro lado, las bacterias cultivadas en caldo LB (37 °C en agitación a 120 rpm durante 18 h), se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 min, luego se transfirieron 500 µL de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para mezclarlo con 250 µL del reactivo de Salkowski. Después de 20 min de incubación en oscuridad, se tomaron 100 µL de la mezcla por triplicado y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos para ser leídas en el espectrofotómetro a 530 nm. El nivel de producción de AIA se calculó con base en la curva de calibración de AIA y se analizaron los datos de tres experimentos independientes por triplicado.

Solubilización de fosfatos

Para estos ensayos se utilizó el agar Pikovskaya (PVK) (Nautiyal, 1999), utilizando como fuente de fosfatos $Ca_3(PO4)_2$ (Fosfato tricálcico). Se inocularon los aislados, previamente cultivados en caldo LB e incubados a 37 °C en agitación a 120 rpm durante 18 h, en cajas Petri (60 mm) con el agar PVK y se dejaron incubando durante 7 días a 28 °C. Pasado el tiempo de incubación, se observó la formación de halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas que solubilizan fosfatos y se determinó el índice de solubilización de fosfato (ISP), con base en la ecuación 2. En estos ensayos se realizaron tres réplicas independientes.

$$\text{ISF ó } IPS = \frac{\text{Diámetro del halo + Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Ecuación 2. Utilizada para calcular el índice de solubilización de fosfato (ISF) y/o, el índice de producción de sideróforos (IPS) (Cisneros *et al*., 2017).

Producción de sideróforos

La prueba de producción de sideróforos se realizó utilizando el medio cromo azul S (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987). El agar CAS se vertió en cajas Petri de 60 mm y se inocularon los aislados bacterianos, previamente crecidos en caldo LB e incubados a 37 °C en agitación a 120 rpm durante 18 h. Los asilados inoculados sobre el medio CAS, se incubaron a 37 °C durante 48 h y la producción de sideróforos se reportó como

positiva cuando el aislado generó un halo color naranja en las UFCs. El índice de producción de sideróforos (IPS) se calculó utilizando la ecuación 2. En estos ensayos se realizaron tres réplicas independientes.

Pruebas de antagonismo sobre hongos fitopatógenos

Los ensayos de antagonismo se realizaron utilizando cepas de hongos fitopatógenos como, *Fusarium sp.* AUC-TZ-2, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium sambucinum* y cepas de *Colletotrichum nymphaeae* y *Colletotrichum siamense* (Robles-Yerena *et al*., 2022; Jiménez-Mejía *et al*., 2023), así una cepa de *Penicillium expansum*, y una de *Rhizopus stolonifer* (Chavez-Díaz *et al*., 2019; Morales-Cedeño *et al*., 2021), todos identificados a nivel molecular. Los hongos se mantuvieron en medio agar dextrosa y papa (PDA Bioxon®) y se dejaron crecer por 5 días a 28 ± 2.0 °C. Se desarrolló la técnica de enfrentamiento dual en cajas Petri de 100 mm con medio PDA, para lo cual se inoculó la bacteria (a 1 cm de distancia del hongo) en dos de los flancos del lugar donde se inoculó el hongo (crecimiento influenciado). Como control, se crecieron los hongos sin inoculación de la bacteria, a los cuales se midió el diámetro de la colonia (crecimiento libre). La ecuación 3 se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición correspondiente. En estos ensayos se realizaron tres réplicas independientes para cada hongo.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento libre} - \text{Crecimiento influenciado}}{\text{Crecimiento libre}} x\ 100$$

Ecuación 3. Determinación del porcentaje de inhibición de hongos (Modificada de Robles-Yerena *et al*., 2022).

Análisis estadístico

Los datos muestran las medias de las réplicas experimentales ± la desviación éstandar. Para cada variable de crecimiento vegetal se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey para determinar la significancia respecto al control ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias y pruebas de germinación y vigor en maíz criollo

Se lograron aislar y purificar 40 microorganismos con diferentes características macroscópicas. Al respecto, la proporción de microorganismos aislados se encuentra dentro de los rangos reportados en otros trabajos en los cuales, a partir de suelos cultivados con arroz, se aislaron e identificaron 42 bacterias (Florez-Márquez *et al*., 2017) y en suelos donde se cultiva plátano (*Musa paradisiaca*), pastos (no se especifican variedades) y maíz, se aislaron 55 microrganismos (Lara-Mantilla *et al*., 2007). La diversidad de microorganismos encontrados en la rizosfera está directamente relacionada con el manejo agrícola que se les da a las tierras de cultivo, ya que el uso excesivo de agroquímicos reduce significativamente la presencia de microorganismos benéficos en el suelo. El tipo de manejo agrícola (poca tecnificación), combinado con el manejo pecuario (incorporación de estiércol bovino) que se le da a la zona de muestreo para este estudio, pudiera estar evitando la degradación de los suelos y por ello encontramos diversidad de microorganismos. Por otra parte, en el presente estudio se identificaron 18 aislados que indujeron un porcentaje de germinación ≥ al 90 %, lo cual coincide con lo reportado por Rojas-Badía *et al*. (2020) quienes, al inocular semillas de maíz con diferentes cepas promotoras del crecimiento vegetal, observaron un porcentaje de germinación superior al 95 %. Al respecto, García-Lemos *et al*. (2020) mencionan que el AIA es un inductor de la germinación de semillas, lo cual se relaciona con los altos porcentajes de germinación, ya que 14 de los 18 asilados producen AIA (Tabla 4). Por otra parte, las BPCV con características endófitas, pueden colonizar las semillas y promover la germinación como mecanismo para realizar una transmisión o diseminación vertical de bacterias endófitas (Thomas y Sahu, 2021).

En la Tabla 2, solamente se plasmaron los resultados de las pruebas de vigor (*in vitro*), de los asilados que mostraron inducir una germinación ≥ al 90 %; y se observó que algunos aislaron promovieron un incremento en los parámetros de peso seco del brote (27.77 % de los aislados), peso seco de la raíz (5.5 % de los aislados) y en peso seco total (27.22 % de los aislados). Los incrementos en los parámetros de peso seco se suelen atribuir a cambios en el potencial osmótico de las plantas, lo cual puede mejorar la absorción de agua y nutrientes (Laynez-Garsaball *et al*., 2007). Por otra parte, el incremento del peso seco se asocia a la biomasa producida durante la correspondiente etapa fenológica de la planta y suele ser un factor determinante en la sanidad de la planta (Marquina *et al*., 2018; Verbon y Liberman, 2016). Adicionalmente, en el presente estudio se observó que solo algunos aislados incrementaron los parámetros evaluados (S1-1, peso seco total; S2-3, peso seco del brote y peso seco total; S3 APS, peso seco de la raíz y peso seco total; S5-1, peso seco total; S7 APS, peso seco del brote) en las pruebas de promoción del crecimiento *in vitro* (vigor) de maíz (Tabla 2). En este sentido, Laynez-Garsaball *et al*. (2007) mencionan que, las características genéticas de la semilla y el tiempo de almacenamiento pueden influenciar el vigor de la mismas, además, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen diversos mecanismos para ello (solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético y de sideróforos, y antagonismo contra hongos fitopatógenos), los cuales pueden actuar a diferentes niveles y en función de la interacción y la etapa fenológica de la planta (De Araujo *et al*., 2012; Rowe *et al*., 2018).

Promoción del crecimiento vegetal *in vivo*

Contrario a lo observado en los ensayos *in vitro*, en esta etapa se observó que diversos aislados mostraron una estimulación del crecimiento en diferentes parámetros (Tabla 3). El 83% de los aislados mostraron datos significativamente mayores, comparados contra el control, en al menos dos, de los seis parámetros evaluados, observando diversidad en la estimulación de las plantas, por parte de las bacterias, es decir, mientras algunas incrementan el peso seco de la raíz

Tabla 2. Efecto *in vitro* de los aislados con un porcentaje de germinación ≥ al 90 %, sobre semillas de maíz criollo mexicano (*Zea mays* L.). Los valores están expresados como el promedio ± la desviación estándar. *Indica disminución estadísticamente significativa respecto al control y, **representa estimulación estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

Table 2. *In vitro* effect of isolates with a germination percentage ≥ 90 % on seeds of Mexican native corn (*Zea mays L.*). Values are expressed as the average ± standard deviation. *Indicates statistically significant decrease compared with the control and **represents statistically significant stimulation compared with the control ($p \leq 0.05$).

	Longitud del brote (cm)	Longitud de raíz (cm)	Longitud total (cm)	Peso seco del brote (mg)	Peso seco de la raíz (mg)	Peso seco total (mg)
CONTROL	7.28 ± 1.14	6.92 ± 1.75	14.20 ± 2.96	27.50 ± 3.54	17.75 ± 2.63	45.25 ± 2.12
S1-1 APS	4.48 ± 1.17	2.66 ± 1.06*	7.14 ± 2.25*	24.44 ± 3.91	14.67 ± 0.47	39.11 ± 1.41
S1-1	5.43 ± 1.32	2.80 ± 0.59*	8.22 ± 1.00*	25.50 ± 2.15	8.29 ± 0.67*	33.79 ± 5.17*
S1-2 APS	2.42 ± 0.69*	2.30 ± 0.97*	4.72 ± 0.58*	20.06 ± 3.08	7.58 ± 2.59*	27.64 ± 1.32*
S1-2	5.84 ± 1.77	3.69 ± 1.51	9.53 ± 3.01	13.67 ± 1.89*	11.44 ± 0.77*	25.11 ± 0.94*
S1-3 APS	5.59 ± 0.40	3.75 ± 1.71	9.34 ± 1.51*	28.83 ± 3.06	13.00 ± 5.16	41.83 ± 6.36
S1-4 APS	5.61 ± 0.61	3.01 ± 0.98*	8.62 ± 0.71*	25.94 ± 2.80	11.71 ± 1.97*	37.65 ± 3.66*
S2 APS	4.09 ± 1.37*	5.54 ± 1.45	9.63 ± 2.07	27.67 ± 6.60	19.67 ± 1.41	47.33 ± 14.50
S2-2	4.50 ± 1.61	2.49 ± 0.56*	6.99 ± 0.90*	18.75 ± 0.35*	8.42 ± 1.30*	27.17 ± 3.42*
S2-3	4.30 ± 0.72*	2.94 ± 0.53*	7.24 ± 0.66*	38.00 ± 0.00**	11.08 ± 0.59*	49.08 ± 2.83**
S2-4	5.44 ± 1.64	2.74 ± 0.90*	8.19 ± 1.45*	34.25 ± 2.47**	7.50 ± 2.12*	41.75 ± 5.30
S3 APS	4.23 ± 0.37*	2.95 ± 0.80*	7.19 ± 0.96*	22.17 ± 0.71*	26.67 ± 1.89**	48.83 ± 2.36**
S3-6	3.17 ± 0.70*	2.33 ± 0.38*	5.50 ± 1.07*	23.06 ± 1.73	10.17 ± 1.04*	33.22 ± 0.24*
S4-3	4.69 ± 0.36	2.44 ± 0.90*	7.13 ± 0.76*	22.21 ± 4.04	10.11 ± 2.83	32.32 ± 2.83*
S5-1	5.96 ± 1.00	3.58 ± 0.77	9.54 ± 1.72	37.42 ± 5.77**	13.67 ± 2.36	51.08 ± 9.43**
S5-2	5.43 ± 1.43	2.86 ± 0.93*	8.28 ± 0.30	19.08 ± 4.83*	7.33 ± 0.47*	26.42 ± 0.71*
S6 APS	4.67 ± 0.96	3.66 ± 0.19*	8.33 ± 1.01*	24.50 ± 2.38	9.33 ± 0.47*	33.83 ± 0.51*
S6-2	4.48 ± 0.19	4.68 ± 0.84	9.17 ± 0.90	36.25 ± 6.01	11.00 ± 1.00*	47.25 ± 3.89
S7 APS	6.26 ± 0.84	2.79 ± 1.48*	9.05 ± 0.79*	33.83 ± 0.24**	12.89 ± 1.58	46.72 ± 0.24

Tabla 3. Efecto *in vivo* de los diferentes aislados, sobre semillas de maíz criollo mexicano (*Zea mays* L.). Los valores están expresados como el promedio ± la desviación estándar. *Indica disminución estadísticamente significativa respecto al control y, **representa estimulación estadísticamente significativa respecto al control (p value ≤ 0.05).

Table 3. *In vivo* effect of diferent isolates on seeds of Mexican native corn (*Zea mays* L.). Values are expressed as average ± standard deviation. *Indicates statistically significant decrease compared with the control and **represents statistically significant stimulation compared with the control (*p value* ≤ 0.05).

	Longitud foliar (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Longitud total (cm)	Peso seco foliar (mg)	Peso seco de la raíz (mg)	Peso seco total (mg)
CONTROL	15.99 ± 1.74	11.40 ± 2.66	27.39 ± 3.50	41.83 ± 12.02	43.50 ± 4.01	85.33 ± 16.03
S1-1APS	16.27 ± 2.38	14.26 ± 2.13	30.54 ± 1.67	48.56 ± 4.76	52.33 ± 3.77**	100.89 ± 4.48**
S1-1	20.78 ± 2.97**	13.02 ± 2.62	33.80 ± 0.23**	52.11 ± 7.67	53.00 ± 12.26	105.11 ± 23.10
S1-2APS	17.83 ± 3.86	12.44 ± 3.87	30.26 ± 2.41	60.67 ± 10.37	35.50 ± 4.48	96.17 ±10.37
S1-2	17.74 ± 2.89	12.69 ± 1.69	30.43 ± 1.66	47.44 ± 5.87	57.89 ± 8.63**	105.33 ± 3.18**
S1-3APS	15.63 ± 2.32	12.70 ± 1.98	28.33 ± 1.85	30.17 ± 3.30*	82.83 ± 4.48**	113.00 ± 15.20**
S1-4APS	21.85 ± 1.42**	12.60 ± 2.15	34.46 ± 0.55**	55.44 ± 7.24	87.83 ± 12.27**	143.28 ± 13.32**
S2APS	20.89 ± 2.75**	10.58 ± 2.57	31.47 ± 3.58	54.33 ± 1.41**	61.89 ± 14.63**	116.22 ± 21.21**
S2-2	22.11 ± 3.16**	12.68 ± 0.41	34.79 ± 3.60**	90.83 ± 5.89**	85.58 ± 9.78**	176.42 ± 15.67**
S2-3	21.41 ± 4.41**	14.06 ± 4.30	35.46 ± 1.58**	53.50 ± 12.02	73.00 ± 2.36**	126.50 ± 6.60**
S2-4	18.73 ± 4.34	12.44 ± 2.01	31.17 ± 1.65	60.83 ± 5.89**	57.33 ± 9.68**	118.17 ± 19.56**
S3APS	18.36 ± 2.88	13.18 ± 1.20	31.54 ± 0.60	50.00 ± 7.07	72.00 ± 2.83**	122.00 ± 10.61**
S3-6	19.41 ± 2.37**	13.07 ± 3.67	32.47 ± 1.74**	60.67 ± 11.02	47.00 ± 12.12	107.67 ± 4.95**
S4-3	14.77 ± 3.08	9.88 ± 3.21	24.65 ± 1.36	48.58 ± 6.24	33.92 ± 3.99*	82.50 ± 7.53
S5-1	17.53 ± 3.56	11.77 ± 3.61	29.30 ± 3.74	37.33 ± 0.94	30.00 ± 9.43*	67.33 ± 10.37
S5-2	21.45 ± 3.13**	11.15 ± 3.37	32.60 ± 4.58	70.00 ± 9.43**	82.50 ± 20.51**	152.50 ± 14.38**
S6APS	20.30 ± 0.91**	11.58 ± 3.65	31.89 ± 2.86	66.71 ± 6.82**	60.38 ± 18.34	127.08 ± 7.07**
S6-2	20.91 ± 2.97**	13.34 ± 3.62	34.26 ± 1.15**	46.72 ± 2.75	44.83 ± 8.78	91.56 ± 10.22
S7APS	17.94 ± 2.12	12.62 ± 3.02	30.56 ± 1.46	58.58 ± 7.35	91.11 ± 19.39**	149.69 ± 3.77**

y el peso seco total (por ejemplo, S1-1APS), otras estimulan la longitud foliar y la longitud total (por ejemplo, S1-1). Esta característica observada en el presente estudio (de estimulación diferencial), refuerza la idea del uso de consorcios bacterianos para incrementar la producción de los cultivos, ya que, las BPCV no cuentan con todos los mecanismos de promoción del crecimiento, cada BPCV participa bajo diferentes mecanismos y en conjunto, logran una sinergia en la promoción del crecimiento de las plantas (Hu *et al.*, 2021). En el 72 % de los aislados se obtuvieron valores más altos de peso seco total de las plantas y el 33.33 % estimularon la longitud total de las plantas de maíz, con respecto al control. Se pueden destacar los aislados S1-4 APS, S2-2, S2-3 y S3-6 por estimular el crecimiento del brote e incrementar el peso seco total de las plantas de maíz, con relación al control. Al respecto, se ha reportado que el incremento en el peso seco está directamente relacionado a un correcto funcionamiento fisiológico de la planta, en el cual las BPCV son fundamentales por brindar nutrientes y factores de crecimiento para la planta (Laynez-Garsaball *et al*., 2007; Marquina *et al*., 2018; Verbon *et al*., 2016). Por otra parte, los datos mostrados en el presente estudio coinciden con los reportados por Rojas-Badía *et al*. (2020), quienes obtuvieron valores similares a los de este trabajo en cuanto longitud y peso seco de plantas de maíz estimuladas con BPCV. Así mismo, se ha reportado que, el uso de microorganismos estimula el crecimiento del maíz en diferentes etapas fenológicas (Huete Arrieta *et al*., 2019; De Araujo *et al*., 2012; Pereira *et al*., 2020). Curiosamente, no se demostraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control, para el parámetro de longitud de la raíz, sin embargo, visualmente fue notorio el cambio en la arquitectura de las raíces tratadas con los aislados nativos S1-1APS, S1-1, S2-3, S3APS, S3-6 y S6-2 (Figura 1), donde se pudo observar un mayor número de raíces secundarias y pelos radiculares. Este efecto, coincide con lo reportado por García-de la Paz *et al*. (2022), quienes muestran que la inoculación con BPCV estimula el crecimiento radicular gracias a la asociación de las bacterias con las raíces del maíz. En el presente estudio, los cambios en la arquitectura de las raíces pudieran estar asociadas a la interacción con los microorganismos, ya que la disponibilidad de nutrientes, como el fosfato brindado a través de los mecanismos de solubilización de fosfatos, y la disponibilidad de hierro asociada a la producción de agentes quelantes, como los sideróforos (Singh *et al*., 2020), pueden influir en un correcto crecimiento de la planta. Además, la síntesis de AIA de los asilados evaluados pudiera estar mediada por la interacción establecida con las raíces de las plantas, ya que uno de los principales exudados radiculares, el triptófano, es considerado el precursor de la biosíntesis de AIA en bacterias, siendo el AIA una de las fitohormonas más estudiadas por su promoción en el crecimiento de la planta (Montesinos, 2003).

Anotación funcional de aislados nativos sobre el maíz criollo mexicano (*Zea mays* L.)

Los 18 aislados nativos, se sometieron a las pruebas bioquímicas para la determinación de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. En la tabla 4 se muestra la anotación funcional de los 18 aislados. Al respecto, el aislado S2-3 fue el único que presentó actividad en todos los mecanismos de promoción evaluados (solubilización de fosfatos, producción de AIA y de sideróforos), además de haber sido uno de los aislados con mejores resultados sobre la promoción del crecimiento vegetal *in vivo* (Tabla 3). Por otra parte, el 50 % de los aislados mostraron dos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y un 38.8 % mostraron solamente un mecanismo de promoción, de los evaluados. A continuación, se describen a detalle los resultados observados en las distintas pruebas, para cada uno de los aislados.

Solubilización de fosfatos

De los 18 aislados evaluados, cinco de ellos (S1-1, S1-2 APS, S2-3, S4-3, S7 APS) mostraron la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, siendo este mecanismo directo de promoción del crecimiento vegetal, uno de los más reportados en diversas rizobacterias, tales como, *Azobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea y Pseudomonas* (Verma

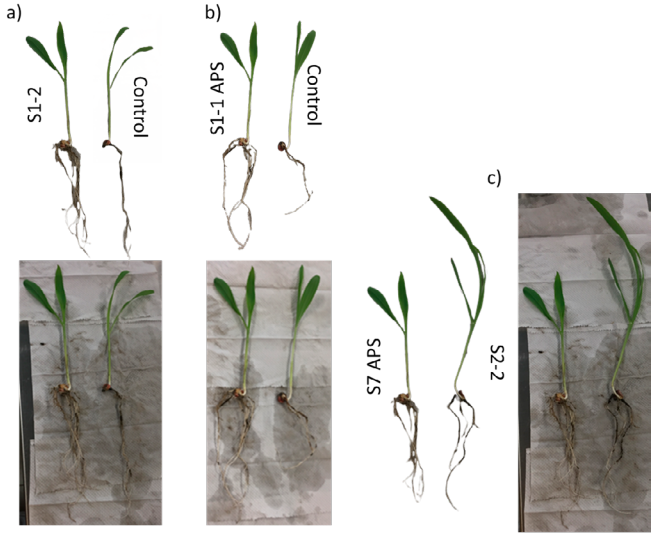


Figura 1. Efecto de los aislados nativos sobre la longitud y arquitectura foliar y radicular en maíz criollo mexicano. Se muestran imágenes representativas de las pruebas de crecimiento in vivo, donde se aprecia el cambio inducido por los aislados nativos, sobre la arquitectura radicular (longitud de raíz primaria, incremento en raíces secundarias y presencia de pelos radiculares), donde a) muestra el aislado nativo S2-1 comparado contra el control (imagen sin fondo y foto original), y b) muestra la imagen sin fondo y la foto original del aislado nativo S1-7 APS. Por otra parte, en c) se observa el incremento asociado al aislado nativo S2-2 con respecto al S7 APS, en cuanto a la longitud foliar y el aumento en el número de hojas (imagen sin fondo y foto original).

Figure 1. Effect of native isolates on length, leaf and root architecture, in Mexican native corn. Representative images of in vivo growth tests are shown. The change induced by the native isolates on the root architecture can be seen (primary root length, increase in secondary roots and presence of root hairs), a) Shows the native isolate S2-1 compared against the control (image without background and original); b) Shows image without background and original of native isolate S1-7 APS; c) the increase associated with native isolate S2-2 compared against S7 APS isolate is observed, in terms of leaf length and the increase in leaves number (image without background and original).

Tabla 4. Anotación funcional de los aislados nativos.
Table 4. Functional annotation of native isolates.

Aislados nativos	Producción de AIA (μg/mL^{-1})	Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Antagonismo contra hongos fitopatógenos						
				Penicillium expansum 230	*Rhizopus stolonifera* C	*Fusarium sp.* AUC-TZ-2	*Fusarium proliferatum*	*Fusarium oxysporum* AUC-TZ-3	*Fusarium sambucinum* AUC-TZ-1	*Colletotrichum nymphaeae AUC-ZM-10*	*Colletotrichum siamense*
S1-1 APS	5.09	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S1-1	3.68	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
S1-2 APS	31.84	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S1-2	0	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
S1-3 APS	5.89	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
S1-4 APS	2.88	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
S2 APS	8.91	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S2-2	5	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
S2-3	21.38	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
S2-4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S3 APS	0	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
S3-6	19.28	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
S4-3	3.4	+	-		-	+	-	-	-	-	-
S5-1	5.66	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S5-2	23.44	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
S6 APS	0	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
S6-2	23.59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S7 APS	8.67	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+

et al., 2015). Al parecer, el hecho de que este mecanismo de promoción este ampliamente distribuido en bacterias, se debe a la baja disponibilidad del nutriente y por ello, las poblaciones que habitan los suelos deben competir por él, por lo que, las BPCV han desarrollado este mecanismo de solubilización. Además, en la simbiosis planta-bacteria, la disponibilidad de fosfatos dado por las bacterias hacia las plantas, tiene como respuesta la disponibilidad de fuentes de carbono (aportadas por las plantas) esenciales para los procesos metabólicos de las bacterias. El fósforo, después del nitrógeno, es el elemento más esencial para el crecimiento de las plantas, ya que constituye aproximadamente el 0.2 % del peso seco de una planta y se ha correlacionado directamente con el incremento en la biomasa (peso seco) de plantas de maíz (Montañez *et al*., 2012; Beltrán Pineda, 2014).

Producción de ácido indol acético (AIA)

De los 18 aislados evaluados, 15 mostraron una producción nativa de AIA, con rangos de producción desde los 3.5 μg/mL^{-1} hasta los 31.84 μg/mL^{-1}, destacando el aislado S1-2APS como el mayor productor de AIA nativo (31.84 μg/mL^{-1}). No obstante, tres aislados no mostraron producción nativa de AIA (Cuadro 1). Dentro de las diversas vías de biosíntesis de AIA, las vías IPyA e IAM son las más estudiadas en bacterias (Zhang *et al*., 2019), incluso, existen reportes de rutas no dependientes de triptófano de las cuales los mecanismos aún no están elucidados. Datos reportados por Marag y Suman (2018), muestran una producción diferencial de AIA en los distintos aislados bacterianos, los cuales van desde la no producción, pasando por rangos de 6.6 hasta los 202.7 μg/mL^{-1}, cabe resaltar que en los ensayos de producción de AIA, adicionan triptófano al medio de cultivo bacteriano, como inductor de la biosíntesis de AIA en bacterias con rutas dependientes de triptófano. Por otro lado, estudios realizados en cepas de *B. cereus*, muestran que estos microorganismos son capaces de sintetizar triptófano (Barceló-Antemate, 2016). Con esta información se puede sugerir que, los aislados evaluados en el presente estudio pueden tener rutas independientes de triptófano o en su defecto, algunos de ellos podrían estar sintetizando el aminoácido triptófano y éste servir como precursor para la biosíntesis de AIA. El AIA está asociado a la estimulación de la división celular, elongación, diferenciación y tropismo de las plantas, por lo que se considera una de las auxinas más importantes para el desarrollo vegetal, sin embargo, en concentraciones elevadas puede reprimir los procesos antes mencionados, siendo este un mecanismo (sobre producción de AIA) utilizado por algunas bacterias fitopatógenas (Mano y Nemoto, 2012; Kawaguchi y Syono, 1996).

Producción de sideróforos

El 50 % de los 18 aislados nativos dieron positivo a la prueba de producción de sideróforos en el agar CAS, donde se observó una conversión al color naranja. Este mecanismo de promoción está asociado a la quelación del hierro (Fe^{+}) por parte de los sideróforos, estás biomoléculas presentan una alta afinidad al Fe^{3+} para secuestrarlo y reducirlo a Fe^{2+}, una forma más soluble y aprovechable para las plantas (Tortora *et al*., 2011). Además, se les ha atribuido un papel importante como un mecanismo antagónico para bacterias y hongos fitopatógenos, ya que las bacterias productoras de sideróforos pueden secuestrar el Fe^{+} disponible en la rizósfera y limitar su acceso para otros microorganismos. Además, existen reportes sobre la activación del sistema de resistencia

inducida de las plantas (Marag y Suman, 2018). En resumen, la actividad sideróforа puede propiciar la disponibilidad de nutrientes para la planta y fungir como un mecanismo de biocontrol.

Antagonismo contra hongos fitopatógenos

Los 18 aislados se confrontaron contra ocho hongos fitopatógenos de interés agrícola. Se demostró que, el 100 % de los aislados muestran actividad antagónica contra, al menos, uno de los hongos fitopatógenos, destacando los aislados S1-1 APS y S6-2 por presentar antagonismo contra todos los hongos evaluados. Los hongos del género *Fusarium* son de interés agrícola por las pérdidas económicas que causan al infectar a los cultivos, además de ser uno de los hongos fitopatógenos de mayor distribución en cultivos agrícolas (Figueroa *et al*., 2010). En el presente estudio se demostró la actividad antagónica de los aislados nativos contra cepas de *Fusarium*, lo cual coincide con lo reportado por León Mendoza (2014), quienes prueban el potencial antagónico de bacterias aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz contra *Fusarium verticilloides*. En el presente trabajo, se observó que el 66.6 % de los aislados presentó efecto antagónico contra, al menos, un hongo del género *Fusarium*. Sin embargo, se observó que *F. proliferatum* fue el más resistente al efecto antagónico de los aislados nativos, ya que solo S1-1 APS y S6-2 mostraron actividad antagónica. Los hongos *Colletotrichum siamense* y *Rhizopus stolonifer* fueron inhibidos por el 72 % de los aislados. Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal indirectos, es la actividad de biocontrol por parte de las BPCV, ya que este mecanismo propicia la sanidad de la planta y le brinda condiciones para destinar su energía al crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Marag y Suman, 2018). En este sentido, la actividad antagónica de las bacterias se debe a la necesidad de competir por un nicho ecológico y lograr la asociación con las raíces de las plantas, por lo cual, es necesario que utilicen mecanismos para competir en la rizósfera, como la producción de sideróforos, de antibióticos o de enzimas líticas, así como la inducción de la resistencia sistémica en la planta (Pérez-y-Terrón *et al*., 2014). Además del género *Fusarium*, existen otros hongos que están asociados a enfermedades, como los causantes de la pudrición de la mazorca y tallo (por géneros de *Penicillium* y *Fusarium*) y la antracnosis (por géneros de *Colletotrichum*). Además, los granos pueden verse contaminados por hongos del género *Penicillium* y *Rhizopus*, lo que se asocia a la contaminación de alimentos por micotoxinas (Rabie *et al*., 1985; Vandicke *et al*., 2021; Wen *et al*., 2021; Belisário *et al*., 2022). Por lo cual, la identificación de bacterias con actividad antagónica frente a hongos, representa una alternativa al uso de fungicidas sintéticos.

CONCLUSIONES

En el presente estudio demostramos la actividad sobre la promoción del crecimiento de plantas de maíz criollo mexicano, de aislados nativos del Municipio de Jiquilpan, Michoacán. De los 40 asilados obtenidos en el muestreo de suelo, identificamos 18 que promueven más del 90 % de la germinación en las semillas de maíz. Además, los aislados S1-4 APS, S2-2, S2-3 y S3-6 destacaron por mostrar incrementos del 20 al 30 % en la longitud del brote, y del 25 hasta el 100 % de aumento en el peso seco total de las plantas de maíz. Estos aislados presentaron diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, directos como la producción de AIA (S1-4 APS, S2-2, S2-3 y S3-6), solubilización de fosfato (S2-3) y producción de sideróforos (S2-2 y S2-3) e indirectos, como el antagonismo contra hongos del género *Penicillium* (S2-3), *Rhizopus* (S1-4 APS, S2-2, S2-3 y S3-6), *Fusarium* y *Colletotrichum* (S1-4, S2-2, S2-3 y S3-6). La presentación por parte de los aislados, de diferentes mecanismos de promoción y los buenos parámetros de crecimiento observados en el maíz, deja abierta la posibilidad de estudiar su efecto promotor como consorcio nativo, el cual pudiera incrementar, aún más, la germinación y el desarrollo de las plantas de maíz criollo mexicano de la región. Estos hallazgos son fundamentales para generar estrategias biotecnológicas acorde a las necesidades particulares de cada región y cultivo. Por lo anterior, es necesario continuar con estudios que robustezcan la información y nos ayuden a seleccionar bacterias con un alto potencial para su aplicación biotecnológica en el maíz.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos, no tener conflicto de intereses con la presente publicación.

REFERENCIAS

Al-Tammar, F.K. y Khalifa, A.Y. Z. 2022. Plant growth promoting bacteria drive food security. Brazilian Journal of Biology, 82, e267257.

Amezquita-Aviles, C.F., Coronel-Acosta, C.B., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G. y Parra-Cota, F.I. 2021. Characterization of native plant growth-promoting bacteria (PGPB) and their effect on the development of maize (*Zea mays* L.). Biotecnia, 24(1): 15-22.

Armada, E., Leite, M.F.A., Medina, A., Azcón, R., y Kuramae, E.E. 2018. Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome. FEMS Microbiology Ecology, 94(7).

Belisário, R., Robertson, A.E., y Vaillancourt, L.J. 2022. Maize Anthracnose Stalk Rot in the Genomic Era. Plant Disease, 106(9), 2281-2298.

Beltrán Pineda, M.E. 2014. Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 15(1):101-113.

Barceló-Antemate, D. 2016. Rutas de síntesis completas de aminoácidos en aislados de *Bacillus cereus* de una comunidad microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila con fenotipo de auxotrofías. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Casasola-Bado M.J. 2022. Importance of a correct Gram stain in identifying bacteria. Revista del Colegio de Microbiología, Química y Clínica de Costa Rica, 27(2): 89-98.

Cisneros R, C.A., Sánchez de P, M. y Menjivar F, J.C. 2017. Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. Revista Colombiana de Biotecnología, 19(1): 21-28.

Chavez-Díaz, I.F., Mena-Violante, H.G., Hernandez-Lauzardo, A.N., Oyoque-Salcedo, G., Oregel-Zamudio, E. y Angoa-Perez, M.V. 2019. Postharvest control of *Rhizopus stolonifer* on black Berry (*Rubus fruticosus*) by blackberry native crop bacteria. Revista de la Facultad de Ciencias Agracias, 51(2): 306-317.

Constantino, M., Gómez, R., Álvarez, J.D., Pat, J.M. y Espín, E.G. 2011. Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. Agronomía Costarricense, 35(1): 15-31.

De Araujo, F.F., Souza, E.C., Guerreiro, R.T., Guaberto, L.M. y De Araujo, A.S.F. 2012. Diversity and growth-promoting activities of *Bacillus* sp. in maize. Revista Caatinga, 25(1): 1-7.

Diario Oficial de la Federación. 2012. Acuerdo por el que se determinan centros de origen y centros de diversidad genética del maíz. [Consultado 15 mayo 2023] 2012. Disponible en: http://www.dof.gob.mx

Figueroa, M., Rodríguez, R., Guerrero, B., González, M. y Pons, J. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 28, 124-134.

Florez-Márquez, J.D., Leal-Medina, G.I., Ardila-Leal, L.D. y Cárdenas-Caro, D.M. 2017. Isolation and characterization of rhizobacteria associated with rice crops (*Oryza sativa* L.) in Norte de Santander (Colombia). Agrociencia, 51(4): 373-391.

García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J.A., y Groppa, M.D. 2017. *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. Microbiological Research, 202, 21-29.

García-de la Paz, N.C., Gallegos-Robles, M.A., González-Salas, U., Rodríguez-Sifuentes, L., Mendoza-Renata, S.S. y Sánchez-Lucio, R. 2022. Potencial de *Bacillus* nativos de la Comarca Lagunera como biofertilizante en la producción de maíz forrajero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 28, 253-261.

Garcia-Lemos, A.M., Großkinsky, D.K., Saleem Akhtar, S., Nicolaisen, M.H., Roitsch, T., Nybroe, O., y Veierskov, B. 2020. Identification of root-associated bacteria that influence plant physiology, increase seed germination, or promote growth of the christmas tree species *Abies nordmanniana*. Frontiers in Microbiology, 11, 566613.

Garcia Ruiz, M. T., Knapp, A. N., y Garcia-Ruiz, H. 2018. Profile of genetically modified plants authorized in Mexico. Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 9(3): 152-168.

Grageda-Cabrera, O.A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J.J. y Vera-Nuñez, J.A. 2012. Impact of biofertilizers in agriculture. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3(6): 1261-1274.

Guillen-de la Cruz, P., Velázquez-Morales, R., de la Cruz-Lázaro, E., Márquez-Quiroz, C. y Osorio-Osorio, R. 2018. Seed germination and vigor of landrace maize populations with different proportion of vitreous endosperm. Chilean Journal Agricultural & Animal Science, 34(2): 108-117.

Haskett, T.L., Tkacz, A., y Poole, P.S. 2021. Engineering rhizobacteria for sustainable agriculture. The International Society for Microbial Ecology Journal, 15(4): 949-964.

Higdon, S.M., Pozzo, T., Tibbett, E.J., Chiu, C., Jeannotte, R., Weimer, B.C. y Bennett, A.B. 2020. Diazotrophic bacteria from maize exhibit multifaceted plant growth promotion traits in multiple hosts. PloS One, 15(9), e0239081.

Hu, J., Yang, T., Friman, V.P., Kowalchuk, G.A., Hautier, Y., Li, M., Wei, Z., Xu, Y., Shen, Q., y Jousset, A. 2021. Introduction of probiotic bacterial consortia promotes plant growth via impacts on the resident rhizosphere microbiome. Proceedings Biological Sciences, 288(1960), 20211396.

Huete Arrieta, Y.R., Torres Domínguez, J. y Dominguez Palacio, D. 2019. Morphological behaviorof maize inoculated with *Azotobacter chroococcum* at reduced dosage of nitrogen fertilizer. Avances, 21(2): 1-9.

Imade, E.E., y Babalola, O.O. 2021. Biotechnological utilization: the role of *Zea mays* rhizospheric bacteria in ecosystem sustainability. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(11): 4487-4500.

Jiménez-Mejía, R., Corona-Márquez, M., Zepeda-García, J.G., Rodríguez-Cárdenas, C., Santoyo, G., Morales-Cedeño, L.R., Medina-Estrada, R.I., Sánchez-Ceja, M. y Loeza-Lara, P.D. 2023. Sodium octanoate-funcionalized chitosan coating reduces dry rot caused by *Fusarium Sambucinum* (AUC-TZ-1) in potato minitubers in storage. Potato Research, 09615.

Kawaguchi, M., y Syono, K. 1996. The excessive production of indole-3-acetic acid and its significance in studies of the biosynthesis of this regulator of plant growth and development. Plant & Cell Physiology, 37(8): 1043-1048.

Korenblum, E., Massalha, H., y Aharoni, A. 2022. Plant-microbe interactions in the rhizosphere via a circular metabolic economy. The Plant Cell, 34(9): 3168-3182.

Lara-Mantilla, C., Villalba-Anaya, M. y Oviedo-Zumaqué, L.E. 2007. Non-symbiotic bacterial diazotrophs from of agricultural crops of San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología, 9(2): 6-14.

Laynez-Garsaball, J.A., Méndez Natera, J.R. y Mayz-Figueroa, J. 2007. Seedling growth from three seed sizes of two corn (*Zea mays* L.) cultivars sowed in sand and watered with three osmoticant solutions of sucrose. IDESIA (Chile), 25(1): 21-36.

León Mendoza, L.H. 2014. Determination of plant growth promoting potential of enterobacteriaceae isolated from the rhizosphere of maize (*Zea mays L.*). Scientia Agropecuaria, 5(2014): 177-185.

Mano, Y., y Nemoto, K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany, 63(8), 2853-2872.

Marag, P.S. y Suman, A. 2018. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). Microbiological Research, 214(2018): 101-113.

Marquina, M.E., Ramírez, Y. y Castro, Y. 2018. Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. var. Cacique Gigante. Bioagro, 30(1): 3-16.

Mau, S., Vega, K. y Sánchez, M. 2011. Isolating soil bacteria and their potential use in systems for wastewater treatment. Tropical Journal of Environmental Sciences, 42(2): 45-52.

Molina, J.E. 2021. The green revolution as a technoscientific revolution: artificialization of agricultural practices and its implications. Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia, 21(42): 175-204.

Montañez, A., Blanco, A.R., Barlocco, C., Beracochea, M. y Sicardi, M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. Applied Soil Ecology, 58, 21-28.

Montesinos, E. 2003. Plant-associated microorganisms: A view from the scope of microbiology. International Microbiology, 6, 221-223.

Morales-Cedeño, L.R., de los Santos-Villalobos, S. y Santoyo, G. 2021. Functional and genomic analysis of *Rouxiella bandensis* SER3 as a novel biocontrol agent of fungal pathogens. Frontiers in Microbiology, 12, 1-14.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1): 265-270.

Olanrewaju, O.S., y Babalola, O.O. 2019. Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(3): 1179-1188.

Parra-Cota, F.I., Peña-Cabriales, J.J., de Los Santos-Villalobos, S., Martínez-Gallardo, N.A., y Délano-Frier, J.P. 2014. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. PloS One, 9(2), e88094.

Pereira, S.I.A., Abreu, D., Moreira, H., Vega, A., y Castro, P.M.L. 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. Heliyon, 6(10), e05106.

Pérez-Rodriguez, M.M., Piccoli, P., Anzuay, M.S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T., Lobato Ureche, M.A., Segura, D.M., y Cohen, A.C. 2020. Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. Scientific Reports, 10(1), 15642.

Pérez-y-Terrón, R., Gonzalez-Montfort, T.S. y Muñoz-Rojas, J. 2014. Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea mays*). Revista Iberoamericana de Ciencias, 1(3): 53-60.

Rabie, C.J., Lübben, A., Schipper, M.A.A., van Heerden, F.R. y Fincham, J.E. 1985. Toxigenicity of *Rhizopus* species. International Journal of Food Microbiology, 1(5):263-270.

Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., y Garcia-Casal, M. N. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Annals of the New York Academy of Sciences, 1312, 105-112.

Robles-Yerena, L., Rodríguez-Mendoza, J., Santoyo, G., Ochoa-Alvarado, X.I., Medina-Estrada, R.I., Jiménez-Mejía, R. y Loeza-Lara, P.D. 2022. Phylogenetic identification of fungi isolated from strawberry and papaya fruits and their susceptibility to fatty acids. The Canadian Journal of Plant and Pathology, 20(8): 44-57.

Rojas-Badía, M., Bello-González, M.A., Ríos-Rocajull, Y.R. y Rodríguez-Sánchez, J. 2020. Plant growth promotion of commercial vegetable crops by *Bacillus* strains. Acta Agronómica, 69(1): 54-60.

Rowe, S.L., Norman, J.S. y Friesen, M.L. 2018. Coercion in the evolution of plant-microbe communication: A perspective. Molecular Plant-Microbe Interactions, 31(8): 789-794.

Sachdev, D.P., Chaudhari, H.G., Kasture, V.M., Dhavale, D.D., y Chopade, B.A. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. Indian Journal of Experimental Biology, 47(12): 993-1000.

Schlemper, T.R., van Veen, J.A., y Kuramae, E.E. 2018. Co-variation of bacterial and fungal communities in different sorghum cultivars and growth stages is soil dependent. Microbial ecology, 76(1): 205-214.

Schwyn, B., y Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160(1): 47-56.

Singh, A., Kumar, M., Verma, S., Choudhary, P. y Chakdar, H. 2020. Plant microbiome: Trends and prospects for sustainable agriculture. Plant Microbe Symbiosis, 129-151.

Thiergart, T., Zgadzaj, R., Bozsóki, Z., Garrido-Oter, R., Radutoiu, S., y Schulze-Lefert, P. 2019. *Lotus japonicus* symbiosis genes impact microbial interactions between symbionts and multikingdom commensal communities. mBio, 10(5), e01833-19.

Tofiño Rivera, A.P., Carbono Murgas, R.E., Melo Ríos, A.E. y Merini, L.J. 2020. Efecto del glifosato sobre la microbiota, calidad del suelo y cultivo de frijol biofortificado en el departamento del Cesa, Colombia. Revista Argentina de Microbiología, 25(1): 61-71.

Thomas, P., y Sahu, P.K. 2021. Vertical transmission of diverse cultivation-recalcitrant endophytic bacteria elucidated using watermelon seed embryos. Frontiers in Microbiology, 12, 635810.

Tortora, M.L., Díaz–Ricci, J.C., y Pedraza, R.O. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Archives Microbiology, 193, 275-286.

Vandicke, J., De Visschere, K., Ameye, M., Croubels, S., De Saeger, S., Audenaert, K. y Haesaert, G. 2021. Multi-Mycotoxin Contamination of Maize Silages in Flanders, Belgium: Monitoring Mycotoxin Levels from Seed to Feed. Toxins, 13(3), 202.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., y Nasrulhaq Boyce, A. 2016. Role of plant growth promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. Molecules (Basel, Switzerland), 21(5), 573.

Velasco-Jiménez, A., Acevedo-Hernández, O., Aarland, R.C. y Rodríguez-Sahagún, A. 2020. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. Terra Latinoamericana, 38(2): 333-345.

Verbon, E.H. y Liberman, L.M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. Trends in Plant Science, 21(3): 218-229.

Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Panjiar, N., Kumar, S., Saxena, A.K. y Suman, A. 2015. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. Annals of Microbiology, 65, 1885-1899.

Wellahausen, E.J., Roberts, E., Hernández, X. y Mangelscorf, P.C. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 236 p.

Wen, J., Shen, Y., Xing, Y., Wang, Z., Han, S., Li, S., Yang, C., Hao, D. y Zhang, Y. 2021. QTL Mapping of Fusarium Ear Rot Resistance in Maize. Plant Disease, 105(3): 558-565.

Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., y Wang, Y. 2019. The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. Molecules, 24(7): 1411.

Zhao, Y., Fu, W., Hu, C., Chen, G., Xiao, Z., Chen, Y., Wang, Z., y Cheng, H. 2021. Variation of rhizosphere microbial community in continuous mono-maize seed production. Scientific reports, 11(1); 1544.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

La proteína Alfa-1 antitripsina y su papel en la fisiopatología del cáncer

Alpha-1-antitrypsin protein and its role in the pathophysiology of cancer

Guadalupe Avalos-Navarro[1], Ramiro Ramírez-Patiño[1], Luis Felipe Jave-Suárez[2] and Emmanuel Reyes-Uribe[1]*

[1] Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Ocotlán, Jalisco, México.

[2] División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México.

ABSTRACT

The α1-AT protein has a wide range of biological functions, mainly protecting the lung against elastases produced by neutrophils. However, it is also related to different pathological processes, such as cancer. Among the types of cancer with which it has been associated are breast, prostate, lung, cervical, bladder and colorectal cancer, among others. Likewise, different studies have reported increased concentrations in cancer patients compared to control subjects. Furthermore, the α1-AT protein has been proposed as a possible biomarker in different types of cancer, and has been related to tumor progression. Currently, the pathophysiological and molecular mechanisms of α1-AT in cancer are still unclear. However, it could be participating in different biological and molecular processes in the tumor microenvironment, which could be a cause of the increase in systemic concentration. In conclusion, the present work focuses on describing the structure of α1-AT and collecting its most relevant functions in physiological and pathological processes, such as cancer.

Keywords: Antiprotease, Tumoral progression, Inflammation, Extracellular matrix, Immune response.

RESUMEN

La proteína α1-AT posee una amplia gama de funciones biológicas, su función principal es proteger al pulmón contra las elastasas producidas por los neutrófilos. Sin embargo, también está relacionada con diferentes procesos patológicos, como el cáncer. Entre los tipos de cáncer a los que se ha asociado se encuentra cáncer de mama, próstata, pulmón, cuello uterino, vejiga y colorrectal, entre otros. Asimismo, diferentes estudios han reportado concentraciones aumentadas en los pacientes con cáncer en comparación con sujetos control. Además, la proteína α1-AT ha sido propuesta como un posible biomarcador en diferentes tipos de cáncer y se ha relacionado con la progresión tumoral. Actualmente, los mecanismos fisiopatológicos y moleculares de la α1-AT en el cáncer aun no son claros. Sin embargo, podría estar participando en diferentes procesos biológicos y moleculares en el microambiente tumoral, lo que podría ser una causa del aumento de la concentración sistémica. En conclusión, el presente trabajo se enfoca en describir la estructura de la α1-AT y recopilar sus funciones más relevantes en procesos fisiológicos y patológicos, como el cáncer.

Palabras clave: Antiproteasa, Progresión tumoral, Inflamación, Matriz extracelular, Respuesta inmune.

INTRODUCCIÓN

La α1-AT es una glicoproteína de 418 aa codificada por el gen *SERPINA1* en el humano, en el locus 14q32.13 (Thun *et al.*, 2013; Stockley, 2015), la cual ejerce efectos pleiotrópicos en el organismo (Tumpara *et al.*, 2020), aun cuando su función efectora principal consiste en inhibir a las proteasas de serina y tripsina sérica y proteger al tejido pulmonar contra la actividad de la elastasa de los neutrófilos ya que α1-AT se une a ella formando complejos (Kunder *et al.*, 2018). Se han descrito variantes genéticas de importancia clínica, principalmente porque su efecto biológico contribuye en la reducción de la concentración de los niveles séricos solubles de α1-AT, relacionados con la predisposición de patologías severas, incluyendo enfisema pulmonar y enfermedad hepática (Bashir *et al.*, 2016; Motawi *et al.*, 2016). Algunos polimorfismos en el gen *SERPINA1* están asociados con el desequilibrio en la concentración de α1-AT (Ortega *et al.*, 2020) con un posible papel en el cáncer (Enewold *et al.*, 2012). En este sentido, múltiples estudios a la fecha han descrito que la participación de α1-AT en el microambiente del tumor a través de diversos mecanismos fisiopatológicos, que incluyen la inhibición de la apoptosis (Lim *et al.*, 2020) mediante la inactivación de caspasas efectoras que promueven la muerte celular programada, y otros tipos de proteasas (Janciauskiene *et al.*, 2011). Mutaciones en genes supresores de tumor, como *p53*, pueden influir en la expresión de α1-AT favoreciendo la progresión de la carcinogénesis; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados no están claros (Shakya *et al.*, 2017). Posiblemente, la α1-AT promueva la fosforilación de la subunidad p85 de PI3K conduciendo a la activación de la proteína Akt, cuya estimulación anormal favorece la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias asociadas a una

*Autor para correspondencia: Emmanuel Reyes-Uribe
Correo.e: emmanuel.reyes@academicos.udg.mx
Recibido: 11 de Marzo de 2024
Aceptado: 5 de Junio de 2024
Publicado: 04 de Julio de 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2287

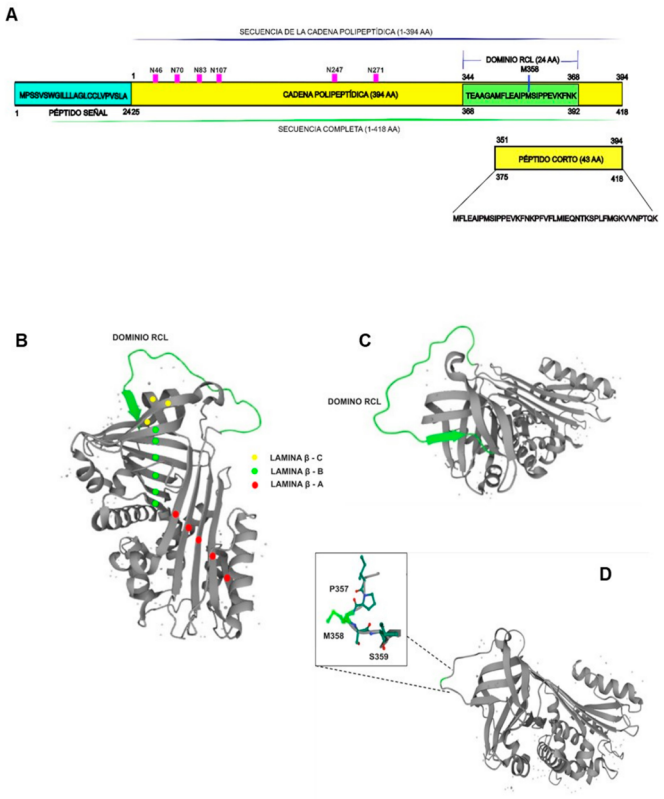
elevada respuesta proliferativa y antiapoptótica (Zhao *et al.*, 2018). También, los altos niveles séricos de α1-AT correlacionan con metástasis y mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón y vejiga (Chang *et al.*, 2012), disminución de la supervivencia y aumento de la resistencia a tratamientos citotóxicos. Esto permite que la α1-AT, sea considerada un biomarcador para cáncer colorrectal (Jaberie *et al.*, 2020).

DESARROLLO

Alfa-1 antitripsina (α1-AT)

La α1-AT pertenece a la superfamilia de las SERPINAs (Serine proteinase inhibitors); es codificada por el gen *SERPINA1* (GenBank NG_008290) ubicado en el cromosoma 14q32.13; posee una longitud de 11.856 kb y está conformado por 5 exones (numerados de 1 al 5) y 4 intrones (De Serres y Blanco, 2014; Foil, 2021). De acuerdo con la base de datos UniProtKB, el transcrito canónico de α1-AT codifica para una cadena polipeptídica de 418 aminoácidos, con un peso molecular de 46.73 kDa. Existen, adicionalmente, dos isoformas de menor tamaño generadas por corte y empalme alternativo con pesos moleculares de 40.26 kDa y 34.75 kDa (https://www.uniprot.org/). La secuencia completa de la α1-AT consta de un péptido señal de 24 aa (aminoácidos: 1-24) en su extremo amino terminal que es necesario para su localización celular, seguido de una cadena polipeptídica madura de 394 aa (aminoácidos: 25-418) que conforman la estructura terciaria con 3 láminas-β (A, B y C), 9 hélices-α y un centro reactivo en la región del C-terminal (dominio RCL) de 24 aa (aminoácidos: 344-368). El mecanismo inhibitorio de la α1-AT se genera a través de la interacción entre su dominio RCL con el centro activo de la proteasa blanco, lo que permite que la proteasa corte este dominio para formar un complejo proteasa- α1-AT estable, inhibiendo irreversiblemente su actividad (Marijanovic *et al.*, 2019).

Las modificaciones postraduccionales pueden originar características especiales y funcionales en las proteínas sintetizadas; por ejemplo, pueden modificar la solubilidad, estabilidad, tiempo de vida media e inducir interacciones con otras proteínas. La glicosilación es una modificación postraduccional que puede estabilizar a las proteínas, protegiéndolas de su degradación, elevando su vida media en el entorno celular. En la proteína α1-AT, las glicosilaciones pueden evitar la formación de agregados, una vez que es secretada (Lechowicz *et al.*, 2020). El 14 % del peso de la α1-AT corresponde a carbohidratos que han sido agregados de forma postraduccional, lo que sugiere que estas modificaciones son esenciales para su función. La proteína α1-AT presenta tres sitios de N-glicosilación, en la Asn 70, Asn 107 y Asn 271, pero se han descrito otros sitios de N-glicosilación, dos sitios ubicados en la Asn 46 y Asn 83, codificadas dentro del exón II y otro sitio en la Asn 247 ubicado en el exón III (Blanchard *et al.*, 2011) (https://www.uniprot.org/). Sin embargo, las diversas formas glicosiladas de la α1-AT y su función han sido poco estudiadas. Adicionalmente, la α1-AT presenta dos sitios de fosfoserina (Ser 38 y Ser 383) y un residuo modificado de S-cisteinilcisteina (Cys 256) (https://www.uniprot.org/)



Características estructurales de la proteína α1-AT. A) La α1-AT contiene en su secuencia completa 418 aa, al eliminarse el péptido señal (24 aa) en el retículo endoplásmico rugoso, la cadena polipeptídica resultante es de 394 aa. En la estructura puede observarse un dominio RCL (Reactive Center Loop) de 24 aa. Además, la proteína muestra varios sitios de N-glicosilación en residuos de asparagina (N) en las posiciones: 46, 70, 83, 107, 247 y 271. Un péptido corto de 43 aa que contiene el dominio RCL puede ser generado a partir de la α1-AT, a través de la actividad de proteasas. Este fragmento puede inhibir quimotripsina, elastasa de neutrófilos, pero carece de efecto inhibitorio en la tripsina. B) Estructura terciaria de la α1-AT (vista de 90°); se pueden observar el dominio RCL y las láminas β: A, B y C, que son características de su estructura. C) Estructura del dominio RCL (vista de 180°); el cual se pliega hacía el exterior de la estructura. La interacción del dominio RCL con la proteasa blanco, es clave en el mecanismo de inhibición de la α1-AT. D) En el dominio RCL se muestra un residuo de metionina (M) en la posición 358, el cual se extiende hacia el exterior de la proteína y dirige la unión con la proteasa blanco. Al lado de la metionina se muestran los residuos de prolina y serina en la posición 357 y 359, respectivamente. Las imágenes B, C y D fueron tomadas y modificadas de UniProtKB (https://www.uniprot.org/); P01009 · A1AT_HUMAN. PDB ID:1HP7, X-ray 2.10 A° (25-418). Último acceso el 2 de marzo del 2024. Las imágenes fueros creadas y/o editadas con Inkscape software license, versión 3.0.

Figura 1. Características estructurales de la proteína α1-AT.
FIGure 1. Structural characteristics of the α1-AT protein.

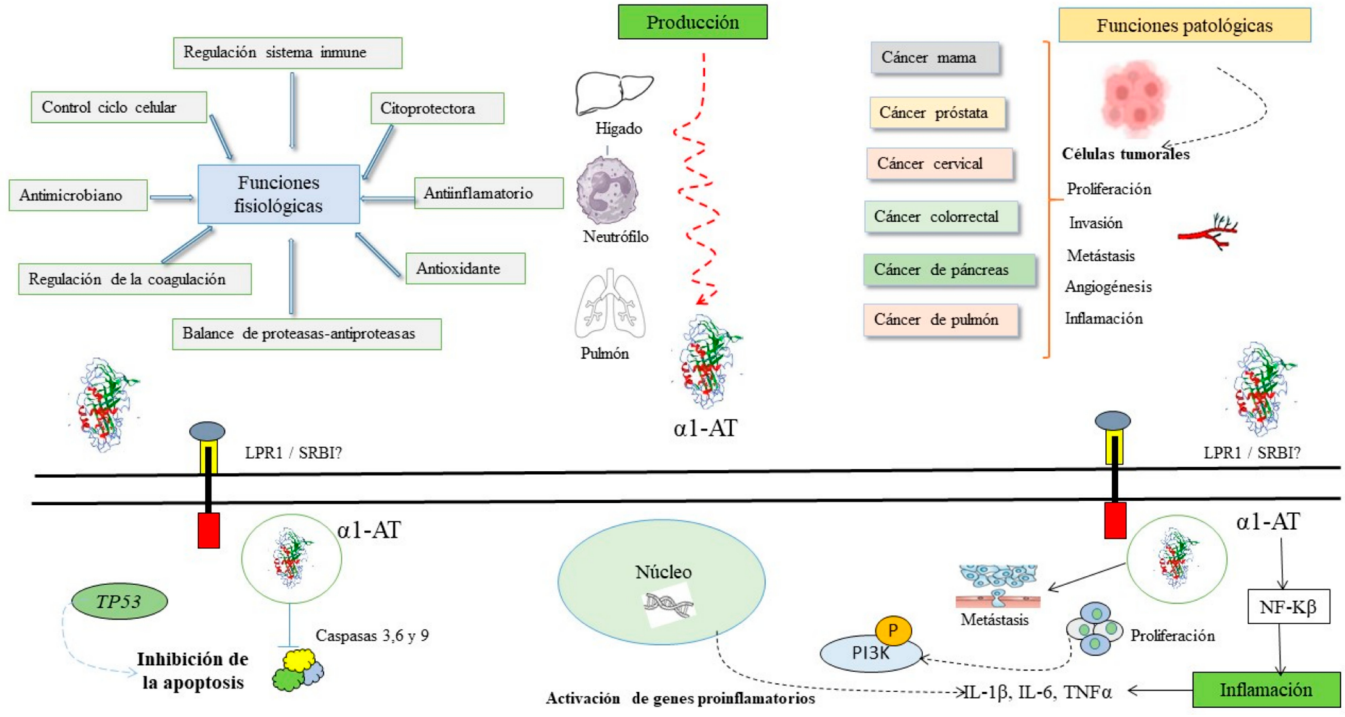
Variantes del gen *SERPINA1*

Existe un alto grado de polimorfismo en el gen *SERPINA1*, con más de 200 variantes. En la base de datos UniProtKB se enlistan 502 variantes, algunas son patogénicas o de importancia clínica y en otras sin un papel definido (Foil, 2021) (https://www.uniprot.org/). El gen humano silvestre de *SERPINA1* codifica la proteína α1-AT normal designada con la letra M, pero existen diversas subvariantes benignas que difícilmente se diferencian con las tecnologías de rutina (Foil, 2021). Se han descrito diversas variantes de relevancia

clínica, incluyendo variantes Z (p.Glu366Lys), S (p.Glu288Val), I (p.Arg63Cys) y F (p.Arg247Cys), generadas por mutaciones puntuales que se manifiestan con una disminución de los niveles séricos de α1-AT y una predisposición al desarrollo de enfisema pulmonar (Barzon *et al.*, 2022). Particularmente, la forma Z se relaciona con el desarrollo de enfisema pulmonar y enfermedad hepática (Tan *et al*., 1976; Foil, 2021). Otras variantes denominadas "raras" ($M_{Heerlen}$, M_{Malton}, $M_{Procida}$, $M_{Würzburg}$, $P_{Brescia}$, y P_{Lowell}) se asocian con el desarrollo de enfermedad pulmonar (EPOC) y/o enfermedad hepática, como resultado de cambios en la concentración sérica de α1-AT, inducción de formas poliméricas de la proteína y/o reducción de la habilidad para inhibir la elastasa de neutrófilos (Foil, 2021). Algunas variantes inducen un plegamiento incorrecto que promueven la formación de polímeros que se acumulan dentro del retículo endoplásmico de los hepatocitos, asociados con hepatitis neonatal, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Barzon *et al.*, 2022). Adicionalmente, diversas formas alélicas nulas de α1-AT ($Q0_{Amrsfoort}$, $Q0_{Mattawa}$, $Q0_{Bellingham}$), donde la proteína no se expresa se han relacionado al desarrollo de enfisema pulmonar. También, ciertos polimorfismos están asociados con el desbalance en los niveles solubles de esta proteína en diferentes padecimientos, incluido el cáncer (Lechowicz *et al.*, 2020). En este sentido, la expresión fenotípica se agrupa en cuatro escenarios de variantes: normales, disminuidas, disfuncionales o nulas, con base en los niveles circulantes de la proteína. Además, el gen *SERPINA* se hereda con un patrón autosómico codominante, lo que quiere decir que cada alelo desempeña un papel en la determinación de los niveles circundantes finales de la proteína (Manne y Kowdley, 2020).

Papel fisiológico de α1-AT

La proteína α1-AT tiene una amplia gama de funciones biológicas, incluyendo la modulación del sistema inmune, reparación de tejido, antioxidante, antimicrobiano, regulación de coagulación, reparadora de tejidos, citoprotectora, regulación de la adhesión celular, migración, proliferación, angiogénesis, control del ciclo celular, entre otras (de Serres y Blanco, 2014; Lorincz y Curiel, 2020; Janciauskiene *et al.*, 2021). Sin embargo, también juegan un papel en procesos patológicos (Lechowicz *et al.*, 2020). La α1-AT forma parte de la respuesta de fase aguda, como un inhibidor de las proteasas de serina y tripsina sérica, proporciona protección al tejido pulmonar contra el daño causado por la elastasa de los neutrófilos. Además, mantiene la homeostasis proteasa-antiproteasa protegiendo el tejido pulmonar de la degradación proteolítica. Es uno de los principales componentes proteicos del plasma sanguíneo, después de la albúmina y las inmunoglobulinas (Kim *et al.*, 1999; López-Árias *et al.*, 2012;



Propiedades fisiológicas y patológicas de la proteína α1-AT. Es Producida principalmente por el hígado para proteger el pulmón de las elastasas producidas por los neutrófilos y regular el balance. En cáncer, participa en la proliferación, invasión, metástasis, inflamación y formación de vasos sanguíneos. Se ha propuesto como posibles receptores a LPR1/SRBI, que favorece su ingreso a la célula a través de endosomas. Una vez dentro, puede activar la vía de señalización NFkB, que favorece la producción de citocinas proinflamatorias por la activación de genes proinflamatorios con retroalimentación positiva. La proliferación mediante la vía PI3K. La α1-AT también puede interaccionar con p53 y bloquear a las caspasas 3, 6 y 9, inhibiendo la apoptosis.

Figura 2. Propiedades fisiológicas y patológicas de la proteína α1-AT.
Figure 2. Physiological and pathological properties of the α1-AT protein.

de Serres y Blanco, 2014; Stockley, 2015; Shakya *et al.*, 2017; Remih *et al.*, 2021).

La α1-AT es sintetizada, dentro del retículo endoplasmático, principalmente en los hepatocitos, así como en células alveolares, intestinales, epiteliales, renales, fagocitos pulmonares y por células tumorales (Janciauskiene *et al.*, 2019; Strnad *et al*., 2020; Vianello *et al.*, 2021). En el hígado hay una producción de 34 mg de α1-AT por kg de peso corporal por día, lo que lleva a un nivel plasmático de 0,9 a 1,75 mg/mL, con una vida media de 3 a 5 días. Los niveles de α1-AT pueden aumentar debido a una amplia variedad de procesos inflamatorios, infecciones, cáncer, enfermedad hepática o embarazo. Durante la respuesta de fase aguda, los niveles de α1-AT aumentan hasta cuatro veces (Sun y Yang, 2004; de Serres y Blanco, 2014; Janciauskiene *et al.*, 2019; Strnad *et al*., 2020). El 80 % de la proteína se difunde en tejido intersticial, mientras que entre el 0.5 - 10.0% se difunde a fluidos biológicos como el fluido alveolar, saliva, lágrimas, leche, semen, bilis, orina y líquido cefalorraquídeo, con una vida media de 4-5 días (De Serres y Blanco, 2014). La concentración plasmática de α1-AT puede aumentar entre 2 y 4 veces debido a citocinas proinflamatorias como IL-6, IL- β, IL-8, IL-17 y TGF-β (Marando *et al*., 2022).

En su función antiproteasa la α1-AT participa en la degradación de proteínas intracelulares en lisosomas y productos de degradación en focos inflamatorios; así como en la degradación de membranas bacterianas, elastina y colágeno-IV, para en la remodelación de la matriz extracelular (Belmonte *et al*., 2016). La α1-AT también participa en la activación de citocinas proinflamatorias, proteólisis de proteínas estructurales, para promover remodelación tisular y generación de fragmentos peptídicos con actividad antibacteriana en el huésped (Crisford *et al*., 2018). También juega un papel en la activación de plasmina, degradación de fibrina, quimiotaxis de monocitos, inflamación del endotelio por la activación de fosfolipasa A2, remodelación tisular mediante la eliminación de tejido necrótico y aumento de la actividad fagocítica de células dendríticas (Draxler *et al.*, 2016; Baker y Strickland, 2020).

Además, de actuar como un inhibidor de proteasas de serina, la α1-AT tiene efectos antiinflamatorios, (a través de los neutrófilos), inhibe la síntesis de superóxido, previniendo la muerte celular de hepatocitos (Ehlers, 2014). Además, disminuye la quimiotaxis de los neutrófilos por limitar la activación de IL-8 mediante la formación del complejo α1-AT / IL-8, lo cual impide la interacción de la IL-8 con su receptor CXCR1. Por otro lado, inhibe la liberación de la proteína de membrana FcγRIIIb ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la quimiotaxis de los neutrófilos, mediante el bloqueo de la actividad enzimática de la metaloproteinasa ADAM-17 (Bergin *et al.*, 2014), reducción de la liberación de TNFα mediante la unión con TNFR1 y 2 impidiendo la degranulación de neutrófilos (Bergin *et al.*, 2014), y activación de la proteína fosfatasa 2A, limitando la liberación de proteínas granulares secundarias y terciarias (Geraghty *et al.*, 2014).

Papel de la α1-AT en el cáncer

El cáncer se caracteriza por el crecimiento sin control de células que pueden originarse de cualquier órgano y tienen la capacidad de sobrevivir, proliferar, infiltrarse y diseminarse a otras partes sanas del cuerpo, esto debido a que las células transformadas comparten un conjunto de características distintivas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Entre las características distintivas de las células cancerosas que nos permiten comprender el comportamiento complejo que presentan, en el 2011 se establecieron ocho sellos funcionales: 1) en los que mantener la señalización proliferativa; 2) evadir los supresores de crecimiento, 3) resistir la muerte celular; 4) capacidad de replicación ilimitada; 5) inducir angiogénesis; 6) activar la invasión y metástasis, 7) reprogramación del metabolismo celular y, 8) evasión de la destrucción inmunitaria (Hanahan y Weinberg, 2011). Posteriormente, se describieron con más detalle los mecanismos moleculares y celulares precisos que permiten que las células preneoplásicas en evolución se desarrollen y adquieran estas capacidades fenotípicas aberrantes; e incluyeron las denominadas características habilitadoras: i) inestabilidad del genoma, ii) inflamación promotora de tumores, iii) desbloqueo de la plasticidad fenotípica, iv) reprogramación epigenética no mutacional, v) microbiomas polimórficos y vi) células senescentes (Hanahan, 2022).

En este sentido, el papel del sistema inmunológico desempeña un papel clave para resolver y eliminar de manera eficiente la transformación maligna, a través de un proceso llamado inmunoedición del cáncer, que consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Wang *et al.*, 2017). En la etapa de eliminación, el sistema inmune reconoce y elimina las células cancerosas emergentes. Las células pueden ser erradicadas por completo o desarrollar variantes resistentes mediante mecanismos de inmunogenicidad y/o secreción de factores que inhiben la respuesta inmunológica, llegando a la etapa de equilibrio. El cáncer puede seguir avanzando debido a que el sistema inmune es incapaz de eliminar las células cancerosas emergentes y estas células progresan hasta diseminarse a otras partes del cuerpo, lo cual se ha denominado fase final o de escape (Bates *et al.*, 2018).

Las células cancerosas evaden o pueden alterar la respuesta inmune del hospedero, mediante diversas formas que aseguran su desarrollo y supervivencia. De tal manera que, modificación del metabolismo de las células inmunitarias y la señalización de células T, así como la inhibición de citocinas en el microambiente tumoral pueden conducir a la supresión inmune y la progresión del tumor en los pacientes (de Aquino *et al.*, 2016).

Existe evidencia de diversas proteínas que están sobreexpresadas y participan en el cáncer favoreciendo su desarrollo, así como el proceso inflamatorio al activar vías de señalización para la proliferación, sobrevida, inflamación y metástasis (Zhao *et al.*, 2018). Diversas citocinas del perfil Th17 e IL-1β, IL-6 y TNFα, están sobreexpresadas, en mujeres con cáncer de mama en diferentes subtipos moleculares y estadios clínicos (Avalos *et al.*, 2019). Entre estas, la proteína

α1-AT ha tomado importancia por su asociación pronóstica, y su uso como un potencial marcador tumoral en diferentes tipos de cáncer, incluidos el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervical, entre otros (Miyake *et al.*, 2013; Timms *et al.*, 2014; Capoun *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018; Janciauskiene *et al.*, 2019; Keeratichamroen *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Hirasawa *et al.*, 2021; Verathamjamras *et al.*, 2023).

La α1-AT tiene propiedades anti-apoptóticas en células malignas, y su expresión esta relacionada con la invasión y metástasis en diversos cánceres humanos debido interrupción de la apoptosis en el microambiente tumoral (Ljujic *et al.*, 2016).

La α1-AT inhibe directamente a la caspasa 3, así como otras caspasas ejecutoras, incluyendo las caspasas 6 y 7, y metaloproteinasas de matriz, lo cual evita la apoptosis (Janciauskiene *et al.*, 2021). Shakya *et al*., en el 2017, demostraron que mutaciones presentes en p53 conducen a una vía oncogénica, a través de la modulación de expresión de diversos genes, destacando el gen de α1-AT, cuya relación es indispensable para el desarrollo de la invasión celular, tanto en modelos *in vivo* e *in vitro.* Aunado a lo anterior, se ha documentado que las células tumorales presentan el oncogén *P53;* cuya función es regular la expresión de genes involucrados en varios procesos celulares que incluyen la reparación del ADN, detención del ciclo celular, apoptosis y participa directamente sobre la expresión de α1-AT y, esta su vez actúa sobre p53, es decir, se genera una retroalimentación positiva, que promueve la invasión y proliferación en células tumorales (Ljujic *et al*., 2016; Shakya *et al*., 2017; Yuan *et al*., 2018).

Al parecer, altos niveles plasmáticos de α1-AT en pacientes con cáncer de páncreas, próstata, cuello uterino, ovario, mama, laringe, colorrectal, linfoma de Hodgkin, entre otros (Tabla 1), están asociados con el factor pronóstico y de progresión de la enfermedad (López-Árias *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018; Janciauskiene *et al.*, 2021).

Se han propuesto diversos mecanismos de acción de la proteína α1-AT en cáncer; sin embargo, no se han dilucidado completamente todos ellos. Por un lado, la proteína α1-AT puede interactuar con el receptor de proteínas de baja

Tabla 1. Estudios de asociación de la proteína α1-AT en cáncer.
Table 1. Association studies of the α1-AT protein in cancer.

Tipo de cáncer	Hallazgo	Referencia
Cáncer de vejiga	Concentraciones incrementadas de la proteína α1-AT en la orina de pacientes con cáncer de vejiga vs. sujetos control (606.4 ng/mL vs 120.0 ng/mL, $p < 0.0001$).	Miyake et al., 2013
Cáncer gástrico	Se encontró baja expresión de la proteína α1-AT en tejido de cáncer gástrico y un incremento en tejido normal adyacente. Se sugirió como posible biomarcador para este tipo de cáncer.	Wu Jeng-Yih et al., 2014
Cáncer de ovario	Se elaboraron perfiles proteómicos de proteínas séricas en muestras de cáncer de ovario y sujetos control. La proteína α1-AT, se encontró incrementada en los estadios III-IV (aprox. 1000 µg/ml) en comparación con muestras benignas.	Timms et al., 2014
Cáncer colorrectal	Se observó que el nivel sérico promedio de α1-AT en pacientes con cáncer colorrectal fue significativamente mayor (208.0 ± 60.0 mg/dL) en comparación con un grupo control (144.0 ± 20.5 mg/dL) ($p = 0.0001$), mediante nefelometría.	Pérez et al., 2014
Cáncer de próstata	Generación de un modelo predictivo con la evaluación de biomarcadores séricos para el cáncer de próstata, incluida la α1-AT, los niveles de las proteínas se correlacionaron con los resultados de las biopsias para detectar cáncer.	Capoun et al., 2015
Cáncer de mama	Elevada expresión de α1-AT en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama triple negativo. El silenciamiento de α1-AT disminuye la activación de las vías PI3K/Akt/mTOR, la migración celular y metástasis.	Zhao et al., 2018
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Se analizaron muestras de suero y tejido pulmonar tumoral. Se observó que un nivel de α1-AT mayor a 2,66 mg/mL en pacientes en etapa III se correlaciona con una disminución en la supervivencia ($p = 0,002$).	Ercetin et al., 2019
Cáncer colorrectal	Niveles incrementados de la proteína α1-AT en pacientes con cáncer colorrectal vs sujetos control (1.05–4.24 g/L (mediana 2.3 g/L) y, 1.01–2.13 g/L (mediana 1.43 g/L) ($p = 0.0001$).	Jaberie et al., 2020
Cáncer cervical	α1-AT sérica se encuentra incrementada en mujeres con cáncer cervical en los estadios III y IV comparado con el grupo control ($P < 0.01$).	Keeratichamroen et al., 2020
Cáncer de vejiga	Determinaron que los niveles urinarios de un panel de biomarcadores, incluida la α1-AT permitió discriminar de forma más precisa entre pacientes con cáncer de vejiga y sujetos control a través de inmunoensayos.	Hirasawa et al., 2021
Cáncer colorrectal	Se reportaron niveles incrementados en plasma de la proteína α1-AT en pacientes con cáncer colorrectal, así como su expresión vs sujetos control.	Verathamjamras et al., 2023

densidad relacionada con la proteína 1 (LRP-1) y el receptor *scavenger* clase b tipo I (SRBI), promoviendo su endocitosis y posterior liberación al citoplasma que induce la fosforilación y activación de AKT, a través del complejo mTORC2 (Janciauskiene *et al.*, 2021). También α1-AT induce la fosforilación de la proteína PI3K (Zhao *et al*., 2018), que promueve la proliferación y supervivencia celular (Zhao *et al.*, 2018).

La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, involucra la activación de receptores de tirosina quinasa (RTKs) presentes en la membrana plasmática como respuesta a la señalización mediada por los factores de crecimiento en la membrana celular con las señales extracelulares como factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento similar a la insulina); además de citocinas, hormonas (Aldecoa *et al*., 2021), α1-AT (Zhao *et al.*, 2018), entre otros.

Diversos estudios demuestran que el incremento significativo de la α1-AT a nivel sistémico en distintos tumores, incluyendo cáncer colorrectal (Pérez-Holanda *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020), de vejiga (Urquidi *et al.*, 2012) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Ercetin *et al.*, 2019), juegan un rol muy importante en la progresión de cáncer, supervivencia, metástasis y resistencia a la quimioterapia (Pérez-Holanda *et al*., 2014; Janciauskiene *et al.*, 2021).

CONCLUSIÓN

La α1-AT es una proteína producida principalmente por el hígado con múltiples funciones biológicas en el organismo. Su disminución en su concentración sérica está asociada a diversas condiciones clínicas como enfisema pulmonar, paniculitis y enfermedad hepática. En contraste, en algunos tipos de cáncer se han reportado niveles séricos incrementados de α1-AT. En estadios avanzados del cáncer la concentración de la proteína se incrementa de forma significativa. Por otro lado, es posible que α1-AT participe en la adquisición de la tolerancia inmunológica o depleción del sistema inmunológico, ya que pacientes con enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico) muestran efectos benéficos al ser tratados con α1-AT. Sin embargo, la deficiencia severa de α1-AT puede incrementar el riesgo de padecer cáncer hepático u otro tipo de neoplasia, lo que comprueba que la biología del tumor es compleja y surge la necesidad de llevar a cabo más estudios que permitan comprender mejor la relación que existe entre la concentración de α1-AT con los mecanismos fisiopatológicos del cáncer, a pesar de que α1-AT ha sido propuesta como un biomarcador de progresión y supervivencia en pacientes.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés

REFERENCIAS

Aldecoa, F. y Ávila, J. 2021. La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. *Horizonte Médico (Lima)*, 21(4), p. e1547. Available at: https://doi.org/10.24265/horizmed.2021.v21n4.15.

de Aquino, M.T.P. *et al.* 2016. Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. *Immunology Letters*, 166(2), pp. 117–133. Available at: https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.018.

Avalos, G. *et al.* 2019. Circulating soluble levels of MIF in women with breast cancer in the molecular subtypes : relationship with Th17 cytokine profile. *Clinical and Experimental Medicine*, pp. 3–9. Available at: https://doi.org/10.1007/s10238-019-00559-6.

Baker, S.K. y Strickland, S. 2020. A critical role for plasminogen in inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 217(4). Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20191865.

Barzon, V. *et al.* 2022. Improving the laboratory diagnosis of M-like variants related to alpha1-antitrypsin deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms23179859.

Bashir, A. *et al.* 2016. Novel variants of SERPIN1A gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*, 117, pp. 139–149. Available at: https://doi.org/10.1016/j.rmed.2016.06.005.

Bates, J.P. *et al.* 2018. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), p. 556. Available at: https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3.

Belmonte, I., Blanco, I., Bustamante, A., Cadenas, S., Casas, F., Curí, S., Chiner, E., Dasí, F., Esquinas, C., Escribano, A., *et al*. 2016. No TitDéficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamientole. *In Respira*. 2da ed, pp. 41–58.

Bergin, D.A. *et al.* 2014. The circulating proteinase inhibitor α-1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Science Translational Medicine*, 6(217). Available at: https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007116.

Blanchard, V. *et al.* 2011. N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), pp. 2118–2128. Available at: https://doi.org/10.1002/bit.23158.

Capoun, O. *et al.* 2015. Diagnostic importance of selected protein serum markers in the primary diagnostics of prostate cancer. *Urologia Internationalis*, 95(4), pp. 429–435. Available at: https://doi.org/10.1159/000431364.

Chang, Y.-H. *et al.* 2012. Secretomic analysis identifies alpha-1 antitrypsin (A1AT) as a required protein in cancer cell migration, invasion, and pericellular fibronectin assembly for facilitating lung colonization of lung adenocarcinoma cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(11), pp. 1320–1339. Available at: https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017384.

Crisford, H., Sapey, E. y Stockley, R.A. 2018. Proteinase 3; a potential target in chronic obstructive pulmonary disease and other chronic inflammatory diseases. *Respiratory Research*, 19(1), p. 180. Available at: https://doi.org/10.1186/s12931-018-0883-z.

Draxler, D., Sashindranath, M. y Medcalf, R. 2016. Plasmin: A modulator of immune function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(02), pp. 143–153. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0036-1586227.

Ehlers, M.R. 2014. Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biological Chemistry*, 395(10), pp. 1187–1193. Available at: https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0161.

Enewold, L. *et al.* 2012. SERPINA1 and ELA2 polymorphisms are not associated with COPD or lung cancer. *Anticancer Research*, 32(9), pp. 3923–3928.

Ercetin *et al.* 2019. Clinical significance of SERPINA1 gene and its encoded alpha1-antitrypsin protein in NSCLC. *Cancers*, 11(9), p. 1306. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers11091306.

Foil, K.E. 2021. Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 12_suppl, pp. 33–48. Available at: https://doi.org/10.1177/20406223211015954.

Geraghty, P. *et al.* 2014. α1 -antitrypsin activates protein phosphatase 2A to counter lung inflammatory responses. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(11), pp. 1229–1242. Available at: https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0872OC.

Hanahan, D. 2022. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. Available at: https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp. 646–674. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hirasawa, Y. *et al.* 2021. Diagnostic performance of Oncuria™, a urinalysis test for bladder cancer. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), pp. 1–10. Available at: https://doi.org/10.1186/s12967-021-02796-4.

Jaberie, H., Hosseini, S.V. y Naghibalhossaini, F. 2020. Evaluation of alpha 1-antitrypsin for the early diagnosis of colorectal cancer. *Pathology & Oncology Research*, 26(2), pp. 1165–1173. Available at: https://doi.org/10.1007/s12253-019-00679-0.

Janciauskiene, S. *et al.* 2019. Clinical significance of serpina1 gene and its encoded alpha1-antitrypsin protein in nsclc. *Cancers*, 11(9). Available at: https://doi.org/10.3390/cancers11091306.

Janciauskiene, S. *et al.* 2021. Potential roles of acute phase proteins in cancer: Why do cancer cells produce or take up exogenous acute phase protein alpha1-antitrypsin?. *Frontiers in Oncology*, pp. 1–10. Available at: https://doi.org/10.3389/fonc.2021.622076.

Janciauskiene, S.M. *et al.* 2011. The discovery of α1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respiratory Medicine*, 105(8), pp. 1129–1139. Available at: https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.02.002.

Keeratichamroen, S. *et al.* 2020. Identification of potential cervical cancer serum biomarkers in Thai patients. *Oncology Letters*, 19(6), pp. 3815–3826. Available at: https://doi.org/10.3892/ol.2020.11519.

Kim, Y. *et al.* 1999. Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling'. 19(16), pp. 6740–6747.

Kunder, M., Lakshmaiah, V. y Moideen Kutty, A. V. 2018. Plasma neutrophil elastase, α1-antitrypsin, α2-macroglobulin and neutrophil elastase–α1-antitrypsin complex levels in patients with dengue fever. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(2), pp. 218–221. Available at: https://doi.org/10.1007/s12291-017-0658-1.

Lechowicz, U. *et al.* 2020. Post-translational modifications of circulating alpha-1-antitrypsin protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), pp. 1–18. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms21239187.

Lim, J.-H. *et al.* 2020. Alpha-1 antitrypsin inhibits formaldehyde-induced apoptosis of human peritoneal mesothelial cells. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 40(2), pp. 124–131. Available at: https://doi.org/10.1177/0896860819887288.

Ljujic, M. *et al.* 2016. ALPHA-1 antitrypsin affects U0126-induced cytotoxicity in colon cancer cell line (HCT116). *Molecular Biology*, 50(1), pp. 153–156. Available at: https://doi.org/10.1134/S002689331601012X.

López-Árias, E. *et al.* 2012. Alpha 1-antitrypsin: A novel tumor-associated antigen identified in patients with early-stage breast cancer. *Electrophoresis*, 33(14), pp. 2130–2137. Available at: https://doi.org/10.1002/elps.201100491.

Lorincz, R. y Curiel, D.T. 2020. Advances in alpha-1 antitrypsin gene therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 63(5), pp. 560–570. Available at: https://doi.org/10.1165/RCMB.2020-0159PS.

Manne, V. y Kowdley, K. V. 2020. Alpha1-antitrypsin deficiency: A cause of chronic liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 24(3), pp. 483–492. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cld.2020.04.010.

Marando, M., Rayroux, C. y Bergeron, A. 2022. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Revue Medicale Suisse*, 18(804), pp. 2169–2174. Available at: https://doi.org/10.53738/REVMED.2022.18.804.2169.

Marijanovic, E.M. *et al.* 2019. Reactive centre loop dynamics and serpin specificity. *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-019-40432-w.

Miyake, M. *et al.* 2013. Investigation of CCL18 and A1AT as potential urinary biomarkers for bladder cancer detection. *BMC Urology*, 13(1), p. 1. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2490-13-42.

Motawi, T. *et al.* 2016. Polymorphisms of α1-antitrypsin and interleukin-6 genes and the progression of hepatic cirrhosis in patients with a hepatitis C virus infection. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 19(2), pp. 35–44. Available at: https://doi.org/10.1515/bjmg-2016-0034.

Ortega, V.E. *et al.* 2020. The effects of rare SERPINA1 variants on lung function and emphysema in SPIROMICS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(5), pp. 540–554. Available at: https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0769OC.

Pérez-Holanda, S. *et al.* 2014. Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls. *BMC Cancer*, 14(1), p. 355. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-355.

Remih, K., Amzou, S. y Strnad, P. 2021. Alpha1-antitrypsin deficiency: New therapies on the horizon. *Current Opinion in Pharmacology*, 59, pp. 149–156. Available at: https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.06.001.

De Serres F. y Blanco I. 2014. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *Journal of Internal Medicine*, 276(4), pp. 311–335. Available at: https://doi.org/10.1111/joim.12239.

Shakya, R. *et al.* 2017. Mutant p53 upregulates alpha-1 antitrypsin expression and promotes invasion in lung cancer. *Oncogene*, 36(31), pp. 4469–4480. Available at: https://doi.org/10.1038/onc.2017.66.

Stockley, R.A. 2015. α1-antitrypsin: A polyfunctional protein?. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(5), pp. 341–343. Available at: https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00094-6.

Strnad, P., McElvaney, N.G. y Lomas, D.A. 2020. Alpha 1 -antitrypsin deficiency. *New England Journal of Medicine*. Edited by D.L. Longo, 382(15), pp. 1443–1455. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMra1910234.

Sun, Z. y Yang, P. 2004. Role of imbalance between neutrophil elastase and α1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncology*, 5(3), pp. 182–190. Available at: https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01414-7.

Tan, S.G., Cunliffe, W.J. y Macgregor, A.J. 1976. Acne mechanica. *British Medical Journal*, 1(6002), p. 130. Available at: https://doi.org/10.1136/bmj.1.6002.130.

Thun, G.A. *et al.* 2013. Causal and synthetic associations of variants in the SERPINA gene cluster with alpha1-antitrypsin serum levels. *PLoS Genetics*. Edited by G. Gibson, 9(8), p. e1003585. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003585.

Timms, J.F. *et al.* 2014. Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(11–12), pp. 982–993. Available at: https://doi.org/10.1002/prca.201400063.

Tumpara, S. *et al.* 2020. The delivery of α1-antitrypsin therapy through transepidermal route: Worthwhile to explore. *Frontiers in Pharmacology*, 11. Available at: https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00983.

Urquidi, V. *et al.* 2012. Diagnostic potential of urinary α1-antitrypsin and apolipoprotein E in the detection of bladder cancer. *Journal of Urology*, 188(6), pp. 2377–2383. Available at: https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.07.094.

Verathamjamras, C. *et al.* 2023. Label-free quantitative proteomics reveals aberrant expression levels of LRG, C9, FN, A1AT and AGP1 in the plasma of patients with colorectal cancer. *Clinical Proteomics*, 20(1), pp. 1–16. Available at: https://doi.org/10.1186/s12014-023-09407-y.

Vianello, A. *et al.* 2021. Correlation between α1-antitrypsin deficiency and SARS-CoV-2 infection: Epidemiological data and pathogenetic hypotheses. *Journal of Clinical Medicine*, 10(19), pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.3390/jcm10194493.

Wang, M. *et al.* 2017. Mechanism of immune evasion in breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 10, pp. 1561–1573. Available at: https://doi.org/10.2147/OTT.S126424.

Wu, D.M. *et al.* 2020. Alpha-1 antitrypsin induces epithelial-to-mesenchymal transition, endothelial-to-mesenchymal transition, and drug resistance in lung cancer cellS. *OncoTargets and Therapy*, 13, pp. 3751–3763. Available at: https://doi.org/10.2147/OTT.S242579.

Yuan, Y. *et al.* 2018. Anti-inflammaging effects of human alpha-1 antitrypsin. *Aging Cell*, 17(1), pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.1111/acel.12694.

Zhao, Z. *et al.* 2018. Silence of α1-antitrypsin inhibits migration and proliferation of triple negative breast cancer cells. *Medical Science Monitor*, 24, pp. 6851–6860. Available at: https://doi.org/10.12659/MSM.910665.

Biotecnia
Journal of biological and health sciences
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Review

Bacterial resistance in diarrhea and tea tree oil as a potential alternative treament: a review

Resistencia bacteriana en diarrea y aceite esencial de arbol de té como potencial tratamiento: revisión

Javier Nicolás González-González[1], Ildefonso Guerrero-Encinas[1], Gloria Guadalupe Morales-Figueroa[1], Gustavo A. González-Aguilar[1], Jesus F. Ayala-Zavala[1], Humberto F. Astiazarán-García[1], Marco A. López-Mata[2], Raymundo R. Rivas-Cáceres[3] & Luis Quihui-Cota[1]*

[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] 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.
[3] Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ave. Plutarco Elías Calles No. 1210, FOVISSSTE Chamizal Cd, Juarez C.P. 32310, México.

ABSTRACT

Bacterial diarrhea is a global health concern, particularly in developing countries like Mexico, where high morbidity and mortality rates persist, especially in children under five years of age. While antibiotics like ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin are effective, increasing bacterial resistance has led to the search for alternatives. Tea tree essential oil (TTEO) has been proposed as a potential treatment, but research, especially *in vivo*, remains limited due to oil composition variability and a lack of standardized protocols. This review compiles current data (2000-2024) on the epidemiology, diagnosis, treatment, and antibiotic resistance of critical diarrhea-causing bacteria (*E. coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., and *Salmonella* spp.) and evaluates TTEO's antibacterial potential. *In vitro* studies show its bactericidal and bacteriostatic effects, while *in vivo* studies assess its therapeutic impact on animal models. In conclusion, TTEO holds promise as an alternative or adjuvant to antibiotics for treating bacterial diarrhea. However, further *in vivo* studies are required to confirm its efficacy and optimize its clinical application.

Keywords: Diarrhea, Antibiotics, Antibiotic-resistant, Essential oils, Tea tree.

RESUMEN

La diarrea bacteriana es un problema de salud pública mundial, especialmente en países en desarrollo como México, donde persisten altas tasas de morbilidad y mortalidad, sobre todo en niños menores de cinco años. Aunque los antibióticos como la ciprofloxacina, ceftriaxona y azitromicina son efectivos, el aumento de la resistencia bacteriana nos ha forzado a buscar alternativas. El aceite esencial de árbol de té (TTEO) ha sido propuesto como tratamiento potencial, pero la investigación, especialmente *in vivo*, es limitada debido a la variabilidad en la composición del aceite y la falta de protocolos estandarizados. Esta revisión recopila datos actuales (2000-2024) sobre la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y resistencia a antibióticos de bacterias clave que causan diarrea (*E. coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.), y evalúa el potencial antibacteriano del TTEO. Los estudios *in vitro* muestran sus efectos bactericidas y bacteriostáticos, mientras que los estudios *in vivo* evalúan su impacto terapéutico en modelos animales. En conclusión, el TTEO tiene potencial como una alternativa o complemento a los antibióticos para tratar la diarrea bacteriana, pero se necesitan más estudios *in vivo* para confirmar su eficacia y optimizar su aplicación en la práctica clínica.

Palabras clave: Diarrea, Antibióticos, Resistente a los antibióticos, Aceites esenciales, Árbol de té.

INTRODUCTION

One of the leading health problems worldwide is malnutrition and infection. Both conditions have been associated with high morbidity and mortality rates in children and adults, resulting in intestinal alterations and a negative impact on nutrient absorption (FDA, 2023). In addition, the indiscriminate or inappropriate use of antibiotics in animals and humans has contributed to the increased bacterial resistance to multiple drugs (van den Bogaard, 2000; Bouarab-Chibane, 2019). Pathogen bacteria such as *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., and *Salmonella* spp. (Hirose and Sato, 2011) are on the list of the highest epidemiological surveillance worldwide, causing mild symptoms to severe diseases (WHO, 2017). Thus, they negatively impact on the host's nutritional status and are associated with alterations in the intestinal mucosa, resulting in a low absorption capacity of nutrients (Fagundes-Neto and Affonso-Scaletsky, 2000).

Natural alternatives with antibacterial properties have been sought, and they may be an appropriate adjuvant for conventional antibiotics (Calo *et al*., 2015). Essential oils (EOs) of some plants have shown antibacterial properties *in vitro*, producing inhibition percentages ranging from deficient (13 %) to very satisfactory (96 %) against some pathogenic bac-

*Author for correspondence: Luis Quihui-Cota
e-mail: lquihui@ciad.mx
Received: February 27, 2023
Accepted: October 8, 2024
Published: November 7, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.2270

teria (Kon and Rai, 2012; Chouhan *et al*., 2017). In addition, EO's components can exert antioxidant effects (Miguel, 2010; Yang *et al*., 2019), which may positively impact the host's nutritional status since they act as functional foods for both animals and humans (Firmino *et al*., 2020).

Search strategy

This review was conducted by retrieving data from reputable scholarly databases, including Google Scholar, PubMed, Springer, Science Direct, and Wiley Online Library. The search used keywords pertinent to the efficacy of tree tea essential oil against *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*, encompassing both *in vitro* and *in vivo* evaluations at the gastrointestinal level. The inclusion criteria for selected studies encompassed publications from 2000 to 2023. Furthermore, an investigation into plant extracts' safety profile and compositional characteristics demonstrating efficacy was undertaken to provide a holistic perspective on their potential applications.

***Shigella* spp.**

Shigella is a Gram-negative bacterium from the Enterobacteriaceae family and causes approximately 125 million diarrhea cases and 160,000 deaths annually, and a third of this figure are children. One of the important clinical aspects of *Shigella* is that even a low infectious dose is associated with aggressive watery diarrhea or bloody diarrhea (Baker and Chung-The, 2018). In addition, this bacterium is the third most isolated pathogen by clinical laboratories in the United States. *Shigella* is subdivided into four major species: *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei* (Bowen, 2018).

Shigellosis is a disease that occurs once the bacteria settle in the intestine. *Shigella* spp. can tolerate the acidic pH of the stomach, colonizing the digestive tract, generating pores in the membrane of epithelial cells, and invading their cytoplasm. *Shigella* spp. can then multiply in adjacent cells without moving through the extracellular medium (Barrantes-Jiménez and Achí-Araya, 2009). Although all *Shigella* spp. can cause bloody diarrhea, *S. dysenteriae* can produce Shiga toxin, which causes hemolytic uremic syndrome, associated with blood in the urine and, occasionally, clots in blood vessels of the kidneys (Lampel, 2012). To prevent this infection, hand washing, food care, precautions in drinking water (especially in developing countries), use of alcohol-based sanitizers, and avoiding fecal exposure in the sexual act are more often recommended (Bowen, 2018). On the other hand, special attention must be paid to fulfill those measures, particularly to children under five years old. In addition, when an infant is infected, special care must be taken so that there is no person-to-person transmission, especially if the child's diaper must be changed (CDC, 2023c).

To diagnose properly, a doctor must suspect shigellosis based on its usual symptoms such as pain, fever, and watery or bloody diarrhea. Subsequently, confirmation is carried out with serological or molecular methods (Lampel, 2012).

***Salmonella* spp.**

Salmonella is a Gram-negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. *Salmonella* strains can cause two types of illnesses: typhoid fever and non-typhoid salmonellosis. Although both cause fever, the former is more severe and has a higher mortality rate (Hammack, 2012). However, globally, non-typhoid salmonellosis is one of the four leading causes of diarrheal illness, with around 153 million cases of gastroenteritis and 57,000 deaths (Hunter and Francois-Watkins, 2018). There are 2,500 serotypes of the two main species, *Salmonella bongori*, and *Salmonella enterica*, the second being the most relevant clinically and in public health (WHO, 2019).

Most *Salmonella* strains are pathogenic due to their ability to invade and survive in host cells. When *Salmonella* enters the digestive tract, it can penetrate epithelial cells by injecting effectors through the membrane into the cytoplasm, or some adhesion systems, detected in strains such as *S. enterica* (Shu-Kee *et al*., 2015). Within these systems, adhesins, invasins, exotoxins, and endotoxins have been identified to ensure its survival in low pH. These properties give specificity to the different serotypes to adapt to the host, promoting the advancement of the disease (Jajere, 2019).

Therefore, since it has been reported that salmonellosis is the most significant foodborne infection worldwide, its prevention is a concern for public health (Jajere, 2019), so risk prevention is focused on primary production to food transportation (WHO, 2019). In addition, the usual safety measures, such as hand washing and precautions when in contact with farm or domestic animals, are recommended. On the other hand, greater caution is recommended in children under five years old, who are the most susceptible to salmonellosis (Hunter and Francois-Watkins, 2018).

Regarding diagnosis, coprological analysis is the selection technique for timely detection. Similarly, this can be detected in cultures from samples of blood, urine, abscesses, and cerebrospinal fluid (Hunter and Francois-Watkins, 2018; CDC, 2022b). In addition, in countries such as the United States, it is important that the laboratories responsible for clinical diagnosis report to the Center for Disease Control and Prevention (CDC) for proper epidemiological surveillance (CDC, 2019).

***Campylobacter* spp.**

Campylobacter is a Gram-negative, spiral S-shaped bacteria belonging to the family Campylobacteriaceae. It causes diarrhea and is one of the most prevalent enteric pathogens in developing and developed countries. In the United States, 1.3 million are infected every year (CDC, 2023a). Although the disease by this bacterium is considered mild, in populations under five years of age, it may be fatal (WHO, 2020), where *Campylobacter jejuni* is the most common agent found associated with diarrheal disease, in Argentina (30.1 %), Peru (23 %) and Colombia (14.4 %) (Fernández, 2011).

C. jejuni is competitive in the intestine of the host, taking DNA from the environment, allowing recombination between strains, and favoring its genetic diversity (Young *et al*., 2007), which allows it to adapt to adverse acidic and aerobic environments. Through flagella and union factors, *C. jejuni* can attach to epithelial cells of the intestine, colonizing the host's intestine and causing severe diarrhea, fever, and blood in the stool (Dasti *et al*., 2010).

There are no vaccines to prevent infection, but prevention is achieved by applying basic hygiene recommendations, such as hand washing, correct cooking of food, and proper treatment of contaminated water (Geissler *et al*., 2018). In addition, some organizations emphasize disease control with timely hygiene measures at all stages of the food chain, from farms to homes (WHO, 2020).

The diagnosis of *C. jejuni* is made with unique isolation and growth conditions due to its microaerophilic characteristics. The stool or rectal samples are inoculated in a selective medium, and the culture is kept at an ideal temperature (42 °C) for 72 h, with 5 % oxygen (Foley, 2012). On the other hand, microscopic visualization has been recommended, where the spiral S shape of the bacterium can be observed to establish an opportune diagnosis. A relevant issue is that laboratories analyze the sample in no more than 2 hours, taking advantage of the unique bacterial characteristics (Geissler *et al*., 2018).

Escherichia coli

E. coli is a group of Gram-negative bacilli and facultative anaerobes belonging to the Enterobacteriaceae family (Vila *et al*., 2016). *E. coli* strains are predominant in the intestinal microbiota of mammals and, specifically, in humans, showing a prevalence higher than 90 % (Denamur *et al*., 2021). At the epidemiological level, the diarrheagenic *E. coli* (DEC) subgroup is the leading cause of diarrhea, a condition that kills infants in developing countries (Hebblestrup, 2014). Around 6 DECs have been identified, including Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxigenic *E. coli* (STEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (O'Reilly *et al*., 2018).

Diseases associated with DEC had a 30–40 % prevalence in Asia, the Middle East Africa, Central America, South America, and Mexico, especially within children populations (Gomes *et al*., 2016; O'Reilly *et al*., 2018). In Mexico, these bacteria represent the top pathogens that cause diarrhea in children, with 30.9 %, followed by *S. enterica* (11.4 %), *Shigella* spp. (10.8 %), and *Campylobacter* spp. (5.6 %) (Rios-Muñiz *et al*., 2019). For example, EPEC has been known to cause 17 to 19% of childhood diarrhea (Vidal *et al*., 2007). On the other hand, ETEC and EAEC, which produce "traveler's diarrhea," affect both children and adults, with prevalences ranging from 5.1 to 12.2 % in Northwest Mexico. The rest of the DEC seems less frequent, with prevalences ranging from 0.2% to 1.4 % (Rios-Muñiz *et al*., 2019).

The pathogenesis of DEC depends on the pathotype and the specific strains. However, most of them mainly affect the small or large intestine, with an incubation period ranging from 8 hours to 10 days, mainly causing watery diarrhea (Gomes *et al*., 2016; O'Reilly *et al*., 2018; Rios-Muñiz *et al*., 2019). Specifically, ETEC, EIEC, EAEC, and STEC adhere to the intestinal mucosa, releasing enterotoxins and cytotoxins that promote inflammation, triggering diarrhea (Vidal *et al*., 2007; O'Reilly *et al*., 2018). In addition, EPEC adheres to the intestinal mucosa, causing a flattening of villi and inflammatory changes, leading to conformational changes and reduction of hydrolysis and absorption of nutrients (Morales-Cruz and Huerta-Romano, 2010). Finally, although little is known about its pathogenicity, DAEC is believed to form a diffuse adherence that induces protruding structures protecting its colonies and allowing disease development (O'Reilly *et al*., 2018).

Some strategies have been proposed to prevent infection by DEC, among which general hygiene in food preparation, hand washing, and food cooking (62.6 °C) stand out. In addition, it is recommended to avoid consuming foods such as raw milk and dairy products and unpasteurized juices (CDC, 2023b). This type of prevention may be impractical for humans since there are different pathogenic strains with different transmission routes. Therefore, the most widely used strategy worldwide is the epidemiological surveillance of specific strains that can contaminate food and infect humans. This strategy includes the detection of potential hazards of specific groups such as STEC, estimation of risk of food contamination, counts of viable organisms to trigger the disease, and timely diagnosis (Newell and La Ragione, 2017).

A diagnosis of EPEC can be carried out using a coprological analysis to confirm the presence of these bacteria. However, diagnostic tests that only detect a subset of STEC, known as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and recently for ETEC, are usually performed in most hospitals due to its prevalence and clinical importance (O´Reilly *et al*., 2018). In the case of EHEC, detection of specific physiological markers produced by the EHEC O157:H7 strain are performed since this is the primary bacterium of this pathotype. Similarly, some tests to detect ETEC are performed by culturing the sample in selective media, such as eosin agar and methylene blue, followed by serotyping or the use of molecular techniques for serotype identification (Morales-Cruz and Huerta-Romano, 2010; Newell and La Ragione, 2017).

Conventional treatment

The usual treatments for gastrointestinal diseases caused by these bacteria, especially diarrhea, are based on fluid and electrolyte replacement (WHO, 2020b). However, in some cases of immunocompetent patients with bloody diarrhea, patients who are immunocompromised, or in contact with another infected patient, antibiotic treatment is recommended (Shane *et al*., 2017). The prescription of these drugs varies depending on different factors, such as the patient's age or the pathogenic bacteria that causes the disease (Cohen *et*

al., 2017). Among the most important and the first choices to treat infections by *E. coli* are azithromycin, ceftriaxone, and ciprofloxacin.

Azithromycin is a second-generation broad-spectrum macrolide antibiotic. Guidelines for treating gastrointestinal diseases, especially diarrhea, recommend this antibiotic to treat *Campylobacter*, *Shigella*, and DEC infections (Shane *et al*., 2017). Its primary mechanism of action is based on bacterial protein synthesis by interfering with their 50S ribosomal subunits (Parnham *et al*., 2014). On the other hand, effective doses vary depending on age, reaching doses of 500 mg (Cohen *et al*., 2017). However, this antibiotic is not recommended in patients with STEC, especially children, since it can cause hemolytic uremia syndrome, characterized by kidney damage, hemolytic anemia, and thrombocytopenia (Tarr *et al*., 2018).

Ceftriaxone is a third-generation cephalosporin prescribed for treating *Salmonella* and *Shigella* infections (Lamb *et al*., 2002). The main action of this antibiotic lies in its ability to inhibit the synthesis of mucopeptides in the bacterial cell wall. In addition, it has been shown that ceftriaxone establishes bonds with the enzymes responsible for cell wall synthesis and cell division, such as carboxypeptidases and endopeptidases, which cause bacterial cell death. Doses range from 20-50 mg/kg for standard treatment, and up to 80 mg/kg in the case of severe infections (Schleibinger *et al*., 2015).

Finally, ciprofloxacin is a fluoroquinolone effective against *Salmonella*, *Shigella*, and *E. coli* (Shane *et al*., 2017; Hunter and Francois-Watkins, 2018). The antimicrobial mechanism is based on inhibiting the DNA gyrase enzyme, a DNA topoisomerase involved in bacterial cell replication. It causes bacterial DNA breaks and suppresses the division of the target cell (Campoli-Richards *et al*., 1988; Ojkic*et al*., 2020). Doses range from 20 mg/kg/day in children to a maximum of 500-1000 mg in adults for 3-5 days (Shane *et al*., 2017; Cohen *et al*., 2017). However, in recent years, the loss of effectiveness of antibiotics against bacteria was reported.

Antibiotic resistance

Drug-resistant diseases currently cause 700,000 deaths per year, and estimations are that by 2050, there will be around 10 million deaths per year (WHO, 2022b). Although antibiotics are the drugs of choice for treating gastrointestinal illnesses caused by bacteria, antibiotic resistance is an increasing problem. This natural phenomenon is observed in some medications, but their indiscriminate use in humans and animals has aggravated this problem (CDC, 2023c).

It has been reported that *Shigella* spp. strains have acquired resistance to antibiotics, including ciprofloxacin (8.9 %) and ceftriaxone (9.3 %) (Puzari *et al*., 2018; Hussen *et al*., 2019). On the other hand, *Campylobacter* spp. strains have developed resistance with prevalences of 45% and 89.9 % to azithromycin and ciprofloxacin, respectively, at their usual doses (Yang *et al*., 2019). In the case of non-typhoidal *Salmonella*, a resistance increase from 12.3 % to 19.2 % in children has been reported in China within a 4-year period (Wu *et al*., 2021). Finally, different *E. coli* strains have presented resistance of up to 14.2, 9, and 20 % to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin, respectively (Eltai *et al*., 2018; Xiang *et al*., 2020).

The WHO and CDC have developed several recommendations and strategies, among which, are the prescription of antibiotics only when necessary, and investing in the development of new antibiotics and vaccines, which are the ones that stand out (WHO, 2022e; CDC, 2023c). Recently, work has been done on developing these new strategies, among which the tea tree essential oil (TTEO) can be found. This essential oil has been proven effective *in vitro* and *in vivo* to inhibit the growth of some bacteria. It may be an alternative or natural adjuvant in treating human and animal bacterial infections (Chouhan *et al*., 2017).

Tea Tree essential oil as alternative treatment

Antimicrobial compounds and preservatives have delayed food spoilage (Perricone *et al*., 2015). EOs have been an alternative since ancient times, gaining relevance in recent years for their antimicrobial properties. In addition, studies have confirmed their different antioxidant and anti-inflammatory properties (Dagli *et al*., 2015). EOs are volatile secondary metabolites produced by plants and are responsible for their aromatic properties (Bakkali *et al*., 2008). In general, EOs are liquid, volatile, and soluble compounds in lipids and organic solvents, which are obtained from different parts of plants (e.g., flowers, seeds, leaves, grouts, and bark) through different extraction techniques (Aziz *et al*., 2018). Among their components stand out the terpenoid and non-terpenic compounds raised by the phenylpropanoid pathway of eugenol, cinnamaldehyde, and safrole (Dhifi *et al*., 2016). The concentration of these components depends on different factors, such as the source of extraction, geographical location, season, and maturity of the plant from which they are extracted (Dagli *et al*., 2015).

TTEO, obtained from *Melaleuca alternifolia*, has been used for almost 100 years in countries such as Australia, due to its properties as a complementary and alternative medicine (Carson *et al*., 2006). This EO contains oxygenated cyclic monoterpenes and hydrocarbons, such as terpinen-4-ol, γ-terpinene, α-terpinene, and 1,8-cineol (Dagli *et al*., 2015). Among them, the predominant is terpinen-4-ol (30-40%), to which most of its bioactivities are attributed (Groot and Schmidt, 2006).

TTEO has shown some *in vitro* antimicrobial properties, for example, as antifungal, especially against *Candida albicans* the leading cause of vaginal infections, with minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 0.06 to 8.0 %. TTEO seems to alter the properties of the membrane and inhibit the respiration of the fungus at MICs from 0.25 % to 1.0 % (v/v) and reaching minimal bactericidal concentration (MBC) (Carson *et al*., 2006). Also, TTEO has shown some effect against viruses that cause herpes, which is better when combined with eucalyptus EO (Gavanji *et al*., 2016). On the other

hand, *in vitro* studies show that TTEO reduce by 50 % of the growth of protozoa such as *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*, and it has inhibited all *Trichomonas vaginalis* at 300 mg/mL (Carson *et al*., 2006).

In summary, TTEO exhibits various antimicrobial properties *in vitro*, supporting its potential application in treating infections caused by various microorganisms. However, it is essential to consider that results from *in vitro* studies may not always translate directly to clinical efficacy, highlighting the need to explore these effects in animal models.

Tea tree oil against bacteria: *in vitro* and *in vivo* assays

Regarding antibacterial properties, concentrations from 0.78 to 50 mg/mL have been tested against bacteria that cause urinary tract infections. This demonstrates the TTEO *in vitro* and *in vivo* ability to reduce bacterial load (Loose *et al*., 2020). Table 1 summarizes some studies reporting their MBC and MIC *in vitro* against *E. coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., and *Salmonella* spp. On the other hand, *in vivo* assays with TTEO (1000 mg/kg), resulted in an increased count of *Lactobacillus* colonies within the cecal contents in Partridge Shank chickens (n = 144) at 50 days of supplementation. Terpinen-4-ol, the primary constituent of TTEO, has been identified to possess selective antimicrobial properties against intestinal pathogens *in vitro*, which results in the modulation of the cecal microbiota composition through the enhanced *Lactobacillus* population because of TTEO supplementation (Qu *et al*., 2019).

Additionally, TTEO as a dietary supplement, at concentrations ranging from 50 to 150 mg/kg in broiler chicken diets, exhibited notable effects. A significant enhancement in daily weight gain (7% approximately) was observed as a reduction in both morbidity and mortality rates (Bakkali *et al*., 2008). Also, the same concentrations described above (50 mg/kg to 150 mg/kg) of TTEO supplementation resulted in an increased average daily feed intake and a tendency of daily gain in weanling piglets (n = 120) after 21 days (Aziz *et al*., 2018).

Table 1. *In vitro* effect of Tea Tree essential oil on different bacteria associated with diarrhea.
Tabla 1. Efecto *in vitro* del aceite esencial de Árbol de Té sobre diferentes bacterias asociadas a la diarrea.

Bacteria	Inhibition zone (mm)	MBC (µL/mL)	MIC (%)	Reference
Shigella spp	-	-	0.25	Harkenthal *et al*., 1999
Campylobacter spp	26.7-30	-	0.001	Kureckci *et al*., 2013
Salmonella spp	37.4	4	-	Swamy *et al*., 2013
E. coli	17.0-35.03	4	0.03-0.5	Bučková *et al*., 2018; Kureckci *et al*., 2019

MBC: Minimum Bactericidal Concentration; MIC: Minimum Inhibitory Concentration.

This study suggested that the passage of these compounds through the gastrointestinal tract might not affect the native microbiota of an organism; however, information is limited, and additional studies exploring its effects in different living organisms may provide more precise information.

On the other hand, the consumption of TTEO encapsulated with n-hexane lactulose, gum Arabic, and maltodextrin for 28 days seems to modulate the microbiota in weanling pigs (n = 144) and reduced the *E. coli* in the intestine and diarrhea episodes (Wang *et al*., 2021). However, despite the evidence about its effective activity against *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, and *E. coli*, additional *in vivo* studies are still required to test the efficacy of a TTEO oral administration against these bacteria in infected animal models.

Some studies administer TTEO orally for other purposes in different animal models. It was observed that the consumption of 0.2 mg/kg of TTEO (60 days) added to the diet of goats (n = 24) improved intestinal immune function (Lv *et al*., 2022). Likewise, using TTEO integrated into the chickens' diet also improved immune function (Abo Ghanima *et al*., 2021). Therefore, these findings indicate that the treatment's potential effects go beyond its antimicrobial activity.

While existing studies have investigated the antibacterial properties of TTEO, a critical research gap exists in understanding its efficacy through oral administration against specific gastrointestinal pathogens in infected animal models. *In vitro* studies have demonstrated TTEO's ability to reduce bacterial load. However, a comprehensive exploration of its effectiveness *in vivo* against critical bacteria such as *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, and *E. coli* must be explored. Current research indicates positive outcomes, such as increased *Lactobacillus* colonies in Partridge Shank chickens and notable effects on growth rates and morbidity in broiler chickens and weanling piglets when supplemented with TTEO in their diets. Nevertheless, the passage of TTEO through the gastrointestinal tract and its impact on native microbiota remains misunderstood. Additionally, despite encapsulation studies showing promise in modulating microbiota and reducing *E. coli* in weanling pigs, more research needs to be done on the oral administration of TTEO, specifically targeting other bacteria in infected animal models. Bridging this gap will provide valuable insights into the practical efficacy and safety of TTEO as an oral therapeutic intervention against gastrointestinal pathogens, informing potential applications and advancing our understanding of microbial communities' impact on different organisms.

Mechanisms to support the TTE biological activities

The mechanisms proposed to explain the TTEO effects are diverse and will depend on the doses used and the analyzed pathogen characteristics. It is suggested that modifying the cell membrane structure is most important, reducing the membrane potential (Swamy *et al*., 2016). In addition, it has been reported that TTEO can affect potassium ion channel homeostasis and interfere with glucose-dependent respiration, affecting bacterial membrane integrity, e.g., *E.*

coli (Yadav *et al*., 2016). Also, TTEO can improve intestinal development, cytokine secretion, gene expression of tight junction proteins, and Notch2 signaling to some extent, surpassing the effect of some antibiotics. The integrity of tight junctions is a crucial indicator of intestinal well-being, and any disturbance in their structure and function is often linked to intestinal stress injury. Perturbations in critical tight junction proteins, including occlusions, claudins, ZOs, and MUC2, can result in augmented intestinal permeability and compromised nutrient transport. In addition, the disruption of tight junctions has been implicated in developing inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, and infectious diarrhea (Dong *et al*., 2019).

On the other hand, previous works have report the toxicity of TTEO in epithelial-like cells (Hela), at IC50 of 2.7 ± 0.07 g/L (Carson and Riley, 1995). Likewise, toxicity tests were also reported in ICR male mice using nano TTEO emulsions in agreement with the guidelines drawn up by the Organization for Economic Co-operation and Development. In this context, it was shown that TTEO nanoemulsions showed lower toxicity (oral LD_{50} 1656 mg/kg) compared to TTEO alone (oral LD_{50} 854 mg/kg). Similarly, the antibacterial activity against *Salmonella typhimurium* and *E. coli* has been tested *in vitro*, concluding that TTEO can be used as a potential oral antimicrobial agent (Wei *et al*., 2021). Emulsions have been proposed as a strategy to make efficient use of TTEO. This system allows for the encapsulation and protection of bioactive compounds in droplets, with sizes ranging from micrometers to nanometers (Singh and Pulikkal, 2022).

The mechanisms underlying the effects of TTEO are multifaceted and contingent, on both the administered doses and the specific characteristics of the studied pathogen. These findings endorse TTEO's suitability as a potential oral antimicrobial agent. Moreover, the adoption of emulsions as a delivery strategy for TTEO is proposed, presenting an efficient means to encapsulate and safeguard bioactive compounds, offering potential applications in antimicrobial interventions.

Challenges in the development of treatments based on essential oils

Effective implementation of essential oil-based antibacterial treatments faces multifaceted challenges that require careful attention in development and clinical application. The variability in the composition of these oils raises questions about the identification of essential compounds, and determining optimal concentrations for consistent antibacterial activity. Furthermore, addressing technical challenges in formulation and administration, along with the need to achieve clinical acceptance, completes the picture of challenges that must be overcome to fully exploit EO's therapeutic potential in treating bacterial infections.

On the other hand, regulation of the consumption of essential oil-based products varies significantly depending on the jurisdiction and the specific purpose of the product. In general, EOs are commonly used in dietary supplements and cosmetic products, and regulations cover aspects such as labeling, allowable concentrations, and safety requirements. When used for medicinal purposes, some countries may subject these products to more rigorous regulations. Regulation on alternative therapies can be diverse, from limited to more detailed, depending on local laws. Safety and toxicity are key considerations, with regulatory agencies evaluating the safety of EO and setting limits to protect consumers. Additionally, in the marketing of dietary supplements, specific regulations regarding content and health claims may apply. Given the constant evolution of the EO industry, consumers and manufacturers should stay informed about local regulations and consult with relevant authorities to ensure regulatory compliance, empowering them with the knowledge to make informed decisions.

The acceptance of products based on EO is diverse and depends on several factors. In recent years, there has been a rise in the popularity of these products, driven by increasing attention towards natural and alternative approaches to wellness. Acceptance may be influenced by factors such as knowledge and education about the associated benefits and risks, personal experience with positive results, cultural and traditional attitudes towards natural medicine, and the general perception of effectiveness. However, acceptance may also vary depending on individual perceptions of alternative medicine and preference for more conventional approaches.

Considering EO as an oral treatment for gastrointestinal bacterial infections involves several key factors. Although *in vitro* studies suggest antimicrobial properties, the transition to clinical efficacy requires further investigation. Local regulations and safety should be considered, as some EOs can be toxic in large quantities in clinical practice. The diversity of gastrointestinal infections and the variability in efficacy against different pathogens are important to evaluate. Finally, using EOs in this context requires not just consideration but also careful evaluation and medical supervision to ensure safety, efficacy, effectiveness, and consideration of individual circumstances, thereby reassuring patients and healthcare professionals about the thoroughness of the treatment process.

CONCLUSIONS

As described, public health concerns about antibiotic-resistant bacteria are growing worldwide. So, essential oils may offer an alternative or adjuvant solution to establish new treatment strategies. Essential oils such as TTEO can potentially be used to treat gastrointestinal diseases associated with bacteria, because of their excellent antimicrobiological properties. However, the effects reported in the literature are primarily *in vitro* studies. So, further studies in animal models are required to investigate the TTEO properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks CIAD and CONAHCYT for supporting this review.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Abo Ghanima, M.M., Swelum, A.A., Shukry, M., Ibrahim, S.A., Abd El-Hack, M.E., Khafaga, A.F., Alhimaidi, A.R., Ammari, A.A., El-Tarabily, K.A. and Younis, M.E.M. 2021. Impacts of tea tree or lemongrass essential oils supplementation on growth, immunity, carcass traits, and blood biochemical parameters of broilers reared under different stocking densities. Poultry Science, 100(11):101443.

Aghraz, A., Benameur, Q., Gervasi, T., Ait Dra, L., Ben-Mahdi, M., Larhsini, M., Markouk, M. and Cicero, N. 2018. Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against Enterobacteriaceae isolates. Letters in Applied Microbiology. 67: 175-182.

Aziz, Z.A.A., Ahmad, A., Setapar, S.H.M., Karakucuk, A., Azim, M.M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M.A. and Ashraf, G. 2018. Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential. Current Drug Metabolism. 19: 1100-1110.

Baker, S. and Chung-The, H. 2018. Recent insights into *Shigella*. Current Opinion in Infectious Diseases, 31, 449-454.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: A review. Food and Chemical Toxicology. 46, 446-475.

Barrantes-Jiménez, K. and Achí-Araya, R. 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* sp. Revista Panamericana de Infectología. 11: 56-61.

Bouarab-Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. and Oulahal, N. 2019. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture. 99: 1457-1474.

Bowen, A. 2018. Shigellosis: En: In Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. G. Brunette (Ed.), pp. 319-320. Oxford University Press, U.K.

Bučková, M., Puškárová, A., Kalászová, V., Kisová, Z. and Pangallo, D. 2018. Essential oils against multidrug resistant gram-negative bacteria. Biologia. 73: 803-808.

Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. and Ricke, S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. Food Control. 54: 111-119.

Campoli-Richards, D.M., Monk, J.P., Price, A., Benfield, P., Todd, P.A. and Ward, A. 1988. Ciprofloxacin. Drugs. 35: 373-447.

Carson, C.F. and Riley, T.V. 1995. Toxicity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* or tea tree oil. Journal of Toxicology and Clinical Toxicology. 33(2): 193-194.

Carson, C.F., Hammer, K.A. and Riley, T.V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a Review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews. 19: 50-62.

CDC. *Campylobacter* (Campylobacteriosis). [Consultado 13 mayo 2023] 2023a. Disponible en: https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html

CDC. *E. coli* (*Escherichia coli*). [Consultado 13 mayo 2023] 2023b. Disponible en: https://www.cdc.gov/ecoli/index.html

CDC. La resistencia a los antibióticos, los alimentos y los animales de producción. [Consultado 13 de mayo 2023] 2023c. Disponible en: https://www.cdc.gov/foodsafety/es/challenges/antibiotic-resistance.html

CDC. *Salmonella*: Diagnostic and Public Health Testing. [Consultado 13 de mayo de 2023] 2019. Disponible en: https://www.cdc.gov/salmonella/general/diagnosis-treatment.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fsalmonella%2Fgeneral%2Fdiagnosis.html

CDC. Shigella-Shigellosis. [Consultado 13 de mayo de 2023] 2023c. Disponible en: https://www.cdc.gov/shigella/prevention-control.html.

Chouhan, S., Sharma, K. and Guleria, S. 2017. Antimicrobial activity of some essential oils—Present status and future perspectives. Medicines. 4(3): 58.

Cohen, R., Raymond, J. and Gendrel, D. 2017. Antimicrobial treatment of diarrhea/acute gastroenteritis in children. Archives de Pédiatrie. 24: 26-29.

Dagli, N., Dagli, R., Mahmoud, R.S. and Baroudi, K. 2015. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry. 5: 335-340.

Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E. and Groß, U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology. 300: 205-211.

Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. and Gordon, D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 19: 37-54.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. and Mnif, W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines. 3: 1-16.

Eltai, N.O., Yassune, H.M., Al-Thani, M.A., Ismail, A., Ibrahim, E. and Alali, W.Q. 2018. Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from fecal samples of food handlers in Qatar. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 7: 1-7.

Fagundes-Neto, U. and Affonso-Scaletsky, I. 2000. *Escherichia coli* infections and malnutrition. The Lancet. 356(27).

FDA. Nutrición e infección, salud y enfermedad. [Consultado 13 de mayo de 2023] 2023. Disponible en: http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s07.htm

Fernández, H. 2011. Campylobacter y Campylobacteriosis: Una mirada desde América del Sur. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 28: 121-127.

Firmino, J.P., Vallejos-Vidal, E., Sarasquete, Ortiz-Delgado, J.B., Balasch, J.C., Tort, L., Estevez, A., Reyez-López, F.E. and Gisbert, E. 2020. Unveiling the effect of dietary essential oils supplementation in *Sparus aurata* gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. Scientific reports. 10(1):17764.

Foley, S. 2012. *Campylobacter jejuni*. En: Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. K.A. Lampel (Ed.), pp. 14-17. FDA, Atlanta.

Gavanji, S., Sayedipour, S.S., Larki, B. and Bakhtari, A. 2015. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. Journal of Acute Medicine. 5: 62-68.

Geissler, A.L., Mahon, B.E. and Fitzgerald, C. 2018. Campylobacteriosis. En: Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. G. Brunette (Ed.), pp. 149-150. Oxford University, New York.

Gomes, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C. and Martinez, M.B. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology. 47: 3-30.

Groot, A.C. and Schmidt, E. 2006. Tea tree oil: Contact allergy and chemical composition. Contact Dermatitis. 75: 128-143.

Hammack, T. 2012. *Salmonella* species. En: Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. K.A. Lampel (Ed.) pp. 9-13. FDA, Atlanta.

Harkenthal, M., Reichling, J., Geiss, H.K. and Saller, R. 1999. Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. Pharmazie. 54: 462-463.

Hebblestrup-Jensen, B., Olsen, K.E., Struve, C. and Krogfelt, K.A. 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 27: 614-630.

Hirose, K. and Sato, E. 2011. Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. Hearing Research. 272: 108-116.

Hunter, J.C. and Francois-Watkins, L.K. 2018. *Salmonella* (Nontyphoidal). En: Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. G. Brunette (Ed.), pp. 304-306. Oxford University Press, New York.

Hussen, S., Mulatu, G. and Kassa, Z.Y. 2019. Prevalence of *Shigella* species and its drug resistance pattern in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 18: 1-11.

Jajere, S.M. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary World. 12: 504-521.

Kabir-Mumu, S. and Mahboob-Hossain, M. 2018. Antimicrobial activity of tea tree oil against pathogenic bacteria and comparison of its effectiveness with eucalyptus oil, lemongrass oil and conventional antibiotics. American Journal of Microbiology Research. 6: 73-78.

Kon, K.V. and Rai, M.K. 2012. Plant essential oils and their constituents in coping with multi-drug-resistant bacteria. Expert Review of Anti-infective Therapy. 10: 775-790.

Kurekci, C., Padmanabha, J., Bishop-Hurley, S.L., Hassan, E., Al-Jassim, R.A. and McSweeney, C.S. 2013. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. International Journal of Food Microbiology. 166: 450-457.

Lamb, H.M., Ormrod, D., Scott, L.J. and Figgitt, D.P. 2002. Ceftriaxone: An update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. Drugs. 62: 1041-1089.

Lampel, K.A. 2012. *Shigella* Species. En: Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. K.A. Lampel (Ed.), pp. 22-25. FDA, Atlanta.

Dong, L., Liu, J., Zhong, Z., Wang, S., Wang, H., Huo, Y., Wei, Z. and Yu L. 2019. Dietary tea tree oil supplementation improves the intestinal mucosal immunity of weanling piglets. Animal Feed Science and Technology. 255: 114209.

Loose, M., Pilger, E. and Wagenlehner, F. 2020. Anti-bacterial effects of essential oils against uropathogenic bacteria. Antibiotics. 9: 1-8.

Lv, X., Chen, L., Zhou, C., Guo, Y., Zhang, G., Kang, J. and Liu, Z. 2022. Dietary tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil supplementation enhances the expressions of amino acid transporters in goat ileal mucosa and improves intestinal immunity. Food Science & Nutrition. 10(11): 3749-3758.

Miguel, M.G. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. Molecules. 15: 9252-9287.

Morales-Cruz, V.G. and Huerta-Romano, J.F. 2010. *Escherichia coli* diarreogénica. Conocimientos vigentes. Revista Mexicana de Pediatría. 77: 271-276.

Newell, D.G. and La Ragione, R.M. 2017. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? Transboundary and Emerging Diseases. 65: 49-71.

O´Reilly, C.E., Iwamoto, M. and Griffin, P.M. 2018. *Escherichia coli*, Diarrheagenic. En: Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. G. Brunette (Ed.), pp. 174-177. Oxford University Press, New York.

Ojkic, N., Lilja, E., Direito, S., Dawson, A., Allen, R.J. and Waclaw, B. 2020. A roadblock-and-kill mechanism of action model for the DNA-targeting antibiotic ciprofloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 64: 1-17.

Parnham, M.J., Haber, V.E., Giamerellos-Bourboulis, E.J., Perletti, G., Verleden, G.M. and Vos, R. 2014. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. Pharmacology Therapeutics. 143: 225-245.

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. 2015. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. Frontiers in Microbiology. 6: 1-7.

Puzari, M., Sharma, M. and Chetia, P. 2018. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. Journal of Infection and Public Health. 11: 451-454.

Qu, H., Cheng, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Li, J., Wen, C. and Zhou, Y. 2019. Dietary tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil supplementation improves growth performance, cecal microflora, immunity, and antioxidant capacity of partridge shank chickens. Journal of Poultry Science. 56(3): 212-219.

Rios-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J.F., Morán-García, N., Meza-Segura, M. and Estrada-García, T. 2019. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos muridos. Gaceta Médica de México. 155: 410-416.

Schleibinger, M., Steinbach, C.L., Topper, C., Kratzer, A., Liebchen, U. and Kees, F. 2015. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in intensive care unit patients. British Journal of Clinical Pharmacology. 80: 525-533.

Shane, A.L., Mody, R.K., Crump, J.A., Tarr, P.I., Steiner, T.S., Kotloff, K. and Pickering, L.K. 2017. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. Clinical Infectious Diseases. 65: 45-80.

Shu-Kee, E., Pusparajah, P., Nurul-Syakima, A.M., Hooi-Leng, S., Kok-Gan, C. and Learn-Han, L. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science. 8: 284-293.

Singh, I.R. and Pulikkal, A.K. 2022. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nanoemulsions: A comprehensive review. OpenNano. 8: 100066.

Swamy, M.K., Akhtar, M.S. and Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016: 1-21.

Tarr, G.A., Oltean, H.N., Phipps, A.I., Rabinowitz, P. and Tarr, P.I. 2018. Strength of the association between antibiotic use and hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157:H7 infection varies with case definition. International Journal of Medical Biology. 308: 921-926.

van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. International Journal of Antimicrobial Agents. 14: 327-335.

Vidal, J., Canizález-Román, A., Futiérrez-Jiménez, J. and Navarro-García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de México. 49: 376-386.

Wang, L., Zhang, Y., Liu, L., Huang, F. and Dong, B. 2021. Effects of three-layer encapsulated tea tree oil on growth performance, antioxidant capacity, and intestinal microbiota of weaned pigs. Frontiers in Veterinary Science. 8: 789225.

Wei, S., Zhao, X., Yu, J., Yin, S., Liu, M., Bo, R. and Li, J. 2021. Characterization of tea tree oil nanoemulsion and its acute and subchronic toxicity. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 124: 104999.

WHO. Enfermedades diarreicas. [Consultado 14 de mayo de 2023] 2017. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease.

WHO. *Salmonella* (no tifoidea). [Consultado 14 de mayo de 2023] 2018. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal).

WHO. *Campylobacter*. [Consultado 14 de mayo de 2023] 2020. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter.

WHO. Resistencia a los antibióticos. [Consultado 14 de mayo de 2023]2020b. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos.

Wu, L.J., Luo, Y., Shi, G.I. and Li, Z.Y. 2021. Prevalence, clinical characteristics and changes of antibiotic resistance in children with nontyphoidal *Salmonella* infections from 2009–2018 in Chongqing, China. Infectious Drug Resistance. 14: 1403-1413.

Xiang, Y., Wu, F., Chai, Y., Xu, X., Yang, L., Tian, S., Zhang, H., Li, Y., Yang, C., Liu, H., Qiu, S., Song, H. and Sun, Y. 2020. A new plasmid carrying mphA causes prevalence of azithromycin resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O6. BMC Microbiology. 20: 1-9.

Yadav, E., Kumar, S., Mahant, S., Khatkar, S. and Rao, R. 2016. Tea tree oil: a promising essential oil. Journal of Essential Oil Research. 29: 1-13.

Yang, C., Zhang, L., Cao, G., Feng, J., Yue, M., Xu, Y., Dai, B., Han, Q. and Guo, X. 2019. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. Journal of Animal Science. 97: 133-143.

Young, K.T., Davis, L.M., and DiRita, V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: Molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 5: 665-679.

Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Research Article

Use and impact of endophytic entomopathogenic fungi: Their potential in the context of agricultural sustainability

Uso e impacto de hongos entomopatógenos endofíticos: Su potencial en el contexto de la sostenibilidad agrícola

Oscar Giovanni Gutiérrez Cárdenas[1]*, Hipolito Cortez Madrigal[2], Agustín Garzón[3]

[1] Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, C. P. 59103, Sahuayo, Michoacán, México.

[2] Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Michoacán. Justo Sierra No. 28. C. P. 59510. Jiquilpan, Michoacán, México.

[3] Unidad de Protección de Cultivos, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Puerta de Hierro, 2, 28040, Madrid, España.

ABSTRACT

The use of entomopathogenic fungi (EF) as endophytes is an environmentally friendly alternative for sustainable food production, given that the current paradigm in crop protection is based on the use of organosynthetic pesticides, with more than two million tons per year worldwide; EF has the ability to live within plant tissues as endophytes, acting as biopesticides. Under this scenario, this review analyzes and discusses the global status of the endophytic entomopathogenic fungi (EEF), their potential in plant protection against plant diseases and insect pests and as plant growth promoters. Successes and failures, and prospects for field application are examined. More than 7000 studies on EEF have been published, with important success cases. However, it is necessary to understand that the agricultural production is based on the use of external inputs, mainly pesticides. While progressive changes occur, it is fundamental to investigate the effect of these substances on the efficacy and persistence of EEF, without neglecting that the lack of knowledge of the effect of biotic and abiotic factors on EEF is an important cause of failures. Future studies should be focused on clarifying aspects such as: application strategies, endophytic persistence and transmission routes to improve the sustainability of agricultural production.

Keywords: endophytes; growth promoters; integrated pest management; plant diseases.

RESUMEN

El uso de hongos entomopatógenos (HE) como endófitos constituye una alternativa para la producción sustentable de alimentos, dado que el paradigma actual en la protección de cultivos se basa en el uso de plaguicidas organosintéticos, con más de dos millones de toneladas anuales. Por estas razones, los HE tienen la capacidad de vivir dentro de los tejidos vegetales como endófitos los cuales actúan como bioplaguicidas. Esta revisión analiza y discute el estatus global de los hongos entomopatógenos endófitos (HEE), su potencial en la protección de plantas contra enfermedades y plagas de insectos y como promotores del crecimiento. Se examinan los éxitos, fracasos y perspectivas de aplicación en campo. Se han publicado más de 7000 estudios sobre HEE con importantes casos de éxito. Sin embargo, es necesario entender que la producción agrícola se basa en el uso de plaguicidas. Mientras ocurren cambios progresivos, es fundamental investigar el efecto de estas sustancias sobre la eficacia y persistencia de los HEE, considerando que el desconocimiento del efecto de los factores bióticos y abióticos sobre los HEE es una causa importante de fracasos. Estudios futuros deberán enfocarse en esclarecer aspectos como estrategias de aplicación, persistencia endófita y vías de transmisión para mejorar la sustentabilidad de la producción agrícola.

Palabras clave: endófitos; enfermedades de plantas; manejo integrado de plagas; promotores del crecimiento.

INTRODUCTION

Along the food production process, a high percentage is consumed by insects. Some of them are considered important pests in agricultural crops, causing losses of 10 to 25 % of world food production, with an estimated value of $ 470 billion (Deutsch *et al*., 2018), with greatest losses (13 - 16 %) documented to occur in the field (Mantzoukas and Eliopoulos, 2020). Under these conditions, the environmentally healthy management of these pests represents a considerable challenge for world food security. Currently, pest management is based on the indiscriminate and extensive use of organosynthetic pesticides, with more than two million tons per year in the world. As a result, more than 500 species of pest insects have developed resistance to various active ingredients; furthermore, the elimination of biological control agents reduces the efficiency of natural control (Carvalho, 2017; Kumar and Kalita, 2017). This implies a strong demand for the development of environmentally friendly alternatives, but at the same time, profitable and reliable for a healthy and sustainable food production.

Biological control is presented as one of the safest strategies within the framework of Integrated Pest Management (IPM). A biological control strategy with high potential in the sustainable management of pests, is the use of fungal entomopathogens. In addition to insects, entomopathogenic fungi (EF) infect mites, nematodes, and even phytopathogenic fungi (Yun *et al*., 2017; Devi, 2018). The species *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin 1912, *Isaria fumosorosea*

*Author for correspondence: Oscar Giovanni Gutiérrez Cárdenas
e-mail: oggutierrez25@gmail.com
Received: March 9, 2023
Accepted: August 28, 2024
Published: September 17, 2024

DOI: 10.18633/biotecnia.v26.1986

Wize, 1904, *Hirsutella thompsonii* FE Fisher 1950, *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff 1879, *M. brunneum* Petch, 1935 and *M. robertsii* Bisch, are some examples of them (Greenfield *et al*., 2016; Jaber and Enkerli, 2016; McKinnon *et al*., 2017; Ahmad *et al*., 2020; Sun *et al*., 2020). Although there are multiple studies on pest control via EF, its greatest use has been through the flood strategy (*e. g.* sprinkling). However, this strategy has been pointed out as one of the least efficient in pest control (Mora-Aguilera *et al*., 2017). This fact, together with the lack of knowledge in the implementation of microbial control as applied epidemiology has caused numerous failures in the use of entomopathogenic fungi in the field (Mora-Aguilera *et al*., 2017). The EF have the potential to be used through various application strategies (*e. g.* the autodissemination by the same target insect) (Kabaluk *et al*., 2015; Mfuti *et al*., 2015; Getahun *et al*., 2016; Gutiérrez-Cárdenas *et al*., 2019). A further advantage that has recently been elucidated for EF is their ability to live endophytically. Under these conditions, they do not harm the plant; on the contrary, they contribute to its protection against pests, growth promotion and antagonism against diseases triggered by phytopathogenic fungi (Barelli *et al*., 2016; Yun *et al*., 2017; Russo *et al*., 2019; Rivas-Franco *et al*., 2020). For example, it has been documented that some species of cultivated plants inoculated with EF, increase their growth (Jaber and Ownley, 2017; Russo *et al*., 2019).

The above has generated an enormous interest in demonstrating the potential of endophytic entomopathogenic fungi (EEF) in the stimulation and promotion of plant growth. However, there are still multiple questions to make the use of EEF more efficient, such as: What is the impact of pesticides on their persistence and effectiveness? What about transgenic plants? What is the best formulation and application technique in greenhouse and field? How do biotic and abiotic factors influence its persistence and effectiveness? This review analyzes and discusses the global status of entomopathogenic fungi as endophytes, their potential for use in agroecosystems, as well as their limitations and possible disadvantages under the current agricultural paradigm.

The discovery of the potential of endophytic entomopathogenic fungi: a historical overview

Insects, plants, and fungi have shared similar environmental conditions throughout their evolution (Khare *et al*., 2018). In the *Metarhizium* genera, its pathogenicity against insects is recognized since 1879 when E. Metchnikoff discovered that the fungus was the cause of death of some arthropods (Stone and Bidochka, 2020). However, it was not long ago that mycologists and entomologists observed in detail the influence that fungi have on insects, and motivated by the interest to understand these interactions, a great opportunity arose for their study and understanding. Thus, Quentin Wheeler, as a proponent of phylogenetic analysis, hoped to encourage entomologists and mycologists to work together, so he organized a Symposium with the participation of the Entomological Society of America, held in Syracuse and Ithaca, New York, USA in 1981 (Vega and Blackwell, 2005). This allowed the foundations to elucidate the mechanisms of these prominent biocontrolling agents. Later, Bing and Lewis (1992) reported the endophytic growth and colonization of *B. bassiana* in maize, in addition to observing for the first time that colonization of the plant by the fungus caused the mortality of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner 1796) (Lepidoptera: Crambidae). The findings documented by Bing and Lewis (1992), are now common to practically all plant species that have been analyzed for endophytic fungi and show that something common in EEF, is that they can colonize plant tissues without damaging the plant, while on the contrary, they bring benefits such as protection against pests and phytopathogens. In addition, it is currently known that EEF naturally colonize cocoa plants, beans, sorghum and wheat, among others (Behie *et al*., 2017; Sánchez-Rodríguez *et al*., 2018; Ambele *et al*., 2020; Mantzoukas and Grammatikopoulos, 2020).

Since then, more than 7000 scientific articles have dealed with a better understanding of the impact of environmental factors (*e. g.* humidity, temperature, presence or limitation of nutrients) in the colonization of plants by fungi, as well as their entomopathogenic role (Vega *et al*., 2009). However, much remains to be understood, which is why it is necessary to lead scientific research towards an approach based on a new paradigm, where EEF can be used massively under field conditions. Therefore, it is still necessary to unravel the full potential of these entomopathogenic agents, including investigations for their use as endophytes, antagonists of plant diseases, colonizers of the rhizosphere and plant growth promoting fungi. This will allow the use of EEF on a large scale as a healthy and sustainable alternative to conventional agrochemicals (Khare *et al*., 2018).

Potential of endophytic entomopathogenic fungi as promoter of plant growth and protection

The term endophytic refers to any organism that establishes a non-obstructive, asymptomatic, and transient cost-benefit relationship within the living tissues of the host plant (Jaber and Ownley, 2017). Endophytic microorganisms constitute a diverse group and can be found in a wide range of plants, including algae, mosses, grasses and other vascular plants (Bamisile *et al*., 2018b). In the case of EEF, they mainly belong to the Phylum Ascomycota, although those belonging to the Phylum Basidiomycota, Oomycota and Zygomycota are also important. An example as EEF use is the fungus belonging to the Basidiomycota phylum, *Leucocalocybe mongolica* (S. Imai) X.D. Yu & Y.J. Yao, 2011 (Agaricales: Clitocybaceae); Wang *et al*. (2022) documented that this fungus was able to promote the growth of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), wheat and cotton, showing that in these plants, when in the presence of *L. mongolica*, the fungus allowed the development of the bacterium *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil 1901 (Bacillales: Bacillaceae), which was able to solubilize phosphorus when the plants were placed under saline stress, thus promoting their growth.

Another more recent example was described by Andersen *et al*. (2024), who applied 10 mL of *Pythium oligandrum* (Pythiales: Pythiaceae) (fungus belonging to the phylum Oomycota) by foliar spray on table potato crops where they included four varieties (Kuras, Desirée, King Edward and Kuras Field) under field conditions and greenhouse. The results obtained revealed that the Kuras genotype responded to *P. oligandrum* treatment with significantly greater plant height and fresh weight of both shoots and roots compared to the untreated treatments, respectively.

Historically, the classification has grouped EEF both inside (colonize grasses), and outside (colonize angiosperms, conifers, ferns, and non-vascular plants) the family Clavicipitaceae (Bamisile *et al*., 2018b). One of the most important ecological functions of EEF as endophytes is the capacity that they confer on the host plant to take up nutrients. This is because the mechanism used by EEF to increase the plant's ability to absorb nutrients, is the plant-fungus symbiosis, which allows the plant to improve nutrient absorption when these fungi increase the effective areas of root absorption through the formation of dextramatrical hyphal length (EMH) (Chen *et al*., 2020; Ai-Tian *et al*., 2021). These hyphae constitute extensions of the fungal mycelium and extend beyond the plant root surface, thereby increasing significantly the volume of soil explored resulting in a greater capacity to absorb water and nutrients, including nitrogen and phosphorus (Mohamed *et al*., 2022; Zeng *et al*., 2024). The response of the plant is an increase in its growth, greater tolerance to stress and production of secondary metabolites, which protect the plant against insects and pathogens (Yun *et al*., 2017; Clifton *et al*., 2018; Ahmad *et al*., 2020).

It has recently been documented that, while some species of fungi function as natural endophytes in plants, others can be deliberately introduced into them using different inoculation methods. For the application of EEF various methods are available, but two of them constitute the majority of scientific studies developed by the scientific community, namely the promotion of plant growth and their impact as biological control agents of plant pathogens (Fontana *et al*., 2021). In this regard, pioneering studies document different application strategies: through known conidia suspensions (Garrido-Jurado *et al*., 2017; Jaber and Enkerli, 2017), direct inoculation of seeds (Ramakuwela *et al*., 2020), injection of inoculum in stems (Mantzoukas and Eliopoulos, 2020), inoculation of roots by immersion (Russo *et al*., 2015), and through irrigation with conidia suspensions (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2018).

There are other mechanisms involved in promoting plant growth mediated by EEF; probably one of the most important is the absorption of nutrients (*e. g.* iron). This has been demonstrated in cabbage crops (*Brassica oleracea* L.) colonized by *B. bassiana* and *M. brunneum*, which promoted significantly longer shoot length (123 % for *B. bassiana* and 53.3 % cm for *M. brunneum*) in comparison with the control treatments (Dara *et al*., 2017). Behie *et al*. (2017), verified the ability of the fungus *M. robertsii* to fix nitrogen derived from corpses of *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) insects and transfer it to bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.), observing a significant increase in root growth (up to 31.8 %). These results have generated greater acceptance and popularity in the use of EEF in agricultural systems, with a significant reduction in agrochemicals, and with it, less damage to the environment and to human and animal health (Dara, 2019; Quesada-Moraga, 2020).

Recent studies conclude that the endophytism carried out by EEF and the close beneficial interactions with plants are a process like that of mycorrhizal fungi (Jaber, 2018). In addition, the EEF confer abiotic resistance to the plant against water stress (drought and waterlogging), salinity and mineral toxicity (Martinez-Medina *et al*., 2016; Wei *et al*., 2020). EEF has now been reported to have the ability to act as antagonists against phytopathogens. For instance, a study carried out with cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) under greenhouse conditions showed that soil inoculation with conidia of *B. bassiana* and *M. brunneum*, induced resistance in plants from 15 % to 57 % against the pathogen *Fusarium oxysporum* Schltdl., 1824 (Hypocreales: Nectriaceae), indicating the potential of EEF in plant protection (Dara *et al*., 2016).

Several capacities of EEF have also been verified (Table 1). Examples of this are observed in the potential of *B. bassiana* to be transmitted inside the soil by endophytically colonizing the roots of various plant species: cacao (*Theobroma cacao* L.) (Ambele *et al*., 2020), barley (*Hordeum vulgare* L.) (Veloz-Badillo *et al*., 2019), strawberry (*Fragaria x ananassa* Weston) (Canassa *et al*., 2020), beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Behie *et al*., 2017), corn (*Zea mays* L.) (Ahmad *et al*., 2020), cassava (*Manihot esculenta* Crantz) (Greenfield *et al*., 2016), soybean (*Glycine max* L.) (Russo *et al*., 2019), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Lee and Kim, 2019) and wheat (*Triticum durum* Desf., and *Triticum aestivum* L.) (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2018; González-Guzmán *et al*., 2020). The above shows that EEF in natural environments colonize and promote plants development, being able to survive in or around them (even in the absence of their host insects) by obtaining nutrients directly from the plant without negatively affecting it. An important consideration within the potential of EF as endophytic is that they indirectly affect pest populations through non-entomopathogenic mechanisms, such as antibiosis and antixenosis (Dara, 2019), and induced systemic resistance (Wei *et al*., 2020). The suggested explanation is that secondary metabolites produced by fungi generate greater resistance to the plant against the attack of pest insects, reducing their appetite, fecundity, fertility, and longevity. Furthermore, the studies confirm that EEF not only affected the development of pests but were also able to promote a significant increase in plant growth (Sánchez-Rodríguez *et al*., 2018; Sun *et al*., 2020; Wei *et al*., 2020).

Effect of pesticides and genetic modified plants

Modern agriculture is based on crop production systems that require the use of agrochemicals to improve and protect

Table 1. Culture, type of endophytic entomopathogenic fungi, application and results obtained as antagonists, against phytophagous insects and for growth promotion.
Tabla 1. Cultivo, tipo de hongo entomopatógeno endófito, aplicación y resultados obtenidos como antagonista contra insectos fitófagos y para la promoción del crecimiento.

Crop	Fungal species	Inoculation type	Result on pest / or controlled disease / improved physiological appearance	Reference
Corn, soy	*Bb*	Si, Ri, Fs	Initial successful colonization (100 %) and persistence of 1.7-2.8 % of the inoculation in 28 days	Russo *et al*. (2015)
Cotton	*Bb, If, Mb*	Sd, Fs	Induction of 15-57 % resistance *vs Fusarium oxysporum*	Dara *et al*. (2016)
Cassava	*Bb, Ma*	Sd	Successful colonization (80-100 %). Persistence (40 %) of 47-49 days after inoculation	Greenfield *et al*. (2016)
Bean	*Bb, Hl, Ma*	Si	Successful inoculation (95-100 %) and significant decrease (25-28 %) in the levels of infestation by *Liriomyza* spp	Gathage *et al*. (2016)
Bean	*Bb, Mb*	Si	Growth promotion and persistence of 64 % for *Bb* and 58 % for *Mb* after 28 days after inoculation	Jaber and Enkerli (2016)
Corn	*Bb*	Fs	Successful colonization (66.66 %) and persistence for 60 days (33.33 %) *vs Chilo partellus*	Renuka *et al*. (2016)
Cabbage	*Bb, If, Mb*	Ss	The fungi *Bb* and *Mb* increased shoot length by 29 and 27.6 cm compared to 13 and 18 cm for controls	Dara *et al*. (2017)
Melon	*Bb, Mb*	Il	Successful colonization (40-98 %) and mortality of *Bemisia tabaci* nymph between 83.9 and 100 %	Garrido-Jurado *et al*. (2017)
Soy	*Bb, Mb*	Si	Successful colonization and 6.25 and 20.8 % of the fungi were recovered in stem and leaf samples	Clifton *et al*. (2018)
Wheat	*Bb, Mb*	Si	Growth promotion (26.9-28.3 *vs* 21.8 cm for control) and reduction of the incidence (50 %) of *Fusarium culmorum*	Jaber (2018)
Wheat	*Bb*	Sc y Sd	Increase in grain yield by 40 % and mortality of 30-57 % of *Spodoptera littoralis* larvae	Sánchez-Rodríguez *et al*. (2018)
Cabbage	*Bb, Ll*	Il	Mortalities of 92-95 % of the aphid *Myzus persicae* after 10 days of the application of conidia	Javed *et al*. (2019)
Tobacco	*Ij*	Ri	Growth promotion (17 cm in height *vs* 12 cm for control) and 4 g increase for inoculated plants *vs* to 2 g for control	Lee and Kim (2019)
Soy	*Bb, Ma, Mr*	Fs, Si, Ri	The isolates of *Bb* showed 45-100 % of colonization, and *Ma* and *Mr* colonized 16-60 % 7 days after inoculation	Russo *et al*. (2019)
Corn	*Mr*	Si	Higher height *vs* control plants (91.54 *vs* 90.03 cm) and lower growth rate of *Agrotis ipsilon* in inoculated plants	Ahmad *et al*. (2020)
Cocoa	*Bb, Hl, Ma*	Si, Fs	Successful colonization (82.2-94.7 %) of *Hl* and 100 % of mortality of *Odontotermes* spp	Ambele *et al*. (2020)
Strawberry	*Bb, Mr*	Ri	Reduction of *Tetranychus urticae* (225.6 ± 59.32) for *Mr*, and 206.5 ± 51.48 for *Bb vs* 534.1 ± 115.55 for control	Canassa *et al*. (2020)
Sorghum	*Bb, If, Mr*	Fs	Mortality of *Sesamia nonagrioides* larvae of 90-93 % and reduction in crop consumption (39-64 %) by the three fungi	Mantzoukas and Grammatikopoulos (2020)
Walnut	*Bb*	Sc	Successful establishment of *Bb* in plants and mortality of 40-42 % of *Curculio caryae* 21 days after inoculation	Ramakuwela *et al*. (2020)
Eggplant	*Cf*	Si	Mortality between 28-33 % of *Bemisia tabaci* pupae	Sun *et al*. (2020)

Bb = *Beauveria bassiana*, *If* = *Isaria fumosorosea*, *Mb* = *Metarhizium brunneum*, *Ma* = *Metarhizium anisopliae*, *Hi* = *Hypocrea lixii*, *Ll* = *Lecanicillium lecanii*, *Ij* = *Isaria javanica*, *Mr* = *Metarhizium robertsii*, *Cf* = *Cordyceps fumosorosea*, Si = Seed inoculation, Ri = Root inoculation, Fs = Foliar spray, Sd = Soil drench, Il = Immersion leaves, Sc = Seed coating.

yields. Production of these substances increased by 11 % annually, from 0.2 million in the 1950 to more than 5 million tons in 2000. Herbicides, insecticides, and fungicides are the groups with the highest sales worldwide, with carbamates, organophosphates, pyrethroids, neonicotinoids and growth regulators being some of the most widely used substances (Carvalho, 2017).

The close association between endophytic fungi and their host plants suggests an important effect of agrochemicals in the former. However, there is still little knowledge in this regard (Zhou *et al*., 2016; da Costa Stuart *et al*., 2018). While several authors report that some pesticides did not affect the diversity of endophytic fungi (Zhou *et al*., 2016; Win *et al*., 2021), others have registered a reduction in diversity in treated crops (da Costa Stuart *et al*., 2018). However, there is consensus in the fact that pesticides can alter the composition of endophytic fungi, because where pesticides were applied, species that were not registered in the untreated crops usually appeared and predominated. It is argued that these changes could negatively influence the physiology of the plant, and probably the quality of the food we consume (Zhou *et al*., 2016; da Costa Stuart *et al*., 2018; Win *et al*., 2021). It is clearly appreciated that the previous studies were developed in different regions, crops and pesticides. Given the wide variety of pesticides (many with systemic activity), crops and varieties, and the complex interactions with the environment, the knowledge about the effect of chemical pesticides on endophytic fungi appears to be still incipient.

Additionally, the aforementioned studies have been focused on endophytic fungi in general, and only sporadically some species of entomopathogens are recorded. Although there is abundant knowledge on the impact of pesticides on entomopathogenic fungi *in vitro* (Pérez-González and Sánchez-Peña, 2017; Wari *et al*., 2020), there is a lack of knowledge about their effect endophytically.

Regarding the potential impacts of genetic engineering technologies on the well-being of farmers and the environment, there is much to analyze, highlighting that the economic effects of genetically modified crops are highly understood (Ganesan *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018; Araus *et al*., 2019). Cotton *Gossypium* spp (Malvaceae) is one of the most important crops worldwide that serves as raw material for textile industries, and has a high economic impact of approximately 600 billion dollars annually (Khan *et al*., 2020). In this sense, genetically modified cotton is in high demand and in its genome is the gene that encodes the *Cry1Ac* protein from *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bacillales: Bacillaceae), which acts as a bioinsecticide against lepidopteran pests. This protein is expressed in these plants throughout their life cycle, and can interact directly with microorganisms associated with the crop, which could negatively affect the environmental functions of the endophytic fungal community (Bruinsma *et al*., 2003). Based on the above, De Souza Vieira *et al*. (2011) report in Brazil the evaluation of a transgenic Bt cotton (Acala 90B) and a natural non-Bt cotton (Acala 90) during different stages of crop development (pre-flowering, flowering, capsule formation and opening), to investigate the possible effects non-target in endophytic fungal communities. The results obtained revealed that the expression of the Bt *Cry1Ac* protein of the genetically modified cotton plants did not affect the degree of fungal colonization, which allowed the obtaining of a total of 17 genera of endophytic fungi, including the species *Acremonium* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Glomerella* spp., *Guignardia* spp., *Lecanicillium* spp., *Nigrospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phoma* spp., *Phomopsis* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Talaromyces* spp., *Tritirachium* spp. and *Xylaria* spp., respectively. In the case of EEF, in a study carried out by Morjan *et al*. (2002), is documented that herbicides used in genetically modified crops of soybeans and corn had negative effects on the fungi *B*. *bassiana*, *M*. *anisopliae*, *Nomuraea rileyi* (Farlow, 1974) (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Neozygites floridana* Weiser & Muma, 1966 (Neozygitales: Neozygitaceae), when exposed to seven standardized 0.96 % formulations (the lowest recommended dose for field applications) that include glyphosate as an active ingredient. In the study, the mycelial growth area and the spore density were estimated, finding that the four analyzed fungi were susceptible to glyphosate. These results are alarming, since spraying these herbicides in large areas and with 100 % coverage in transgenic crops can be detrimental to EEF and thus, negatively impact the natural epizootics necessary for the suppression of pest insects. Meanwhile, other studies mention that the flow of genes transferred horizontally in genetically modified crops is considered an important evolutionary force that alters gene frequencies through mutations, genetic drift and selection (Lu and Yang, 2009). In this sense, gene flow can negatively affect the environment by creating a reduction in the genetic variability of native populations, the alteration of biodiversity and the alteration of the soil microenvironment. For these reasons, the introduction of genetically modified plants in agroecosystems poses potential risks for the species that inhabit it, including EEF, with the premise that it is difficult to predict their consequences in the future, possibly leading to the development of superweeds, the evolution of new viral pathogens and the evolution of pest insects with resistance to new compounds (Tsatsakis *et al*., 2017). For these reasons, it is important to analyze and discuss the long term and large-scale impact of genetically modified crops on other non-target organisms in agricultural ecosystems before carrying out their approval and release into the environment. It is also necessary to make efforts that favor the design of new products, as well as contribute to the improvement of application devices. Besides, the growing public concern about the excessive use of agrochemicals and genetically modified organisms has triggered a social pressure for a transition towards agroecological pest management. Given this scenario, Lechenet *et al*. (2017) highlights that it is possible to achieve a significant decrease in the use of herbicides, fungicides, and insecticides (37, 47 and 60 %, respectively) through the adoption of new production strategies where biological control is of fundamental importance.

Considerations in the application of endophytic entomopathogenic fungi: the elucidation of its potential in sustainable agriculture

For its implementation in agricultural systems, EEF must be applied to plants, at least through three possible strategies: to the seed, to the foliage or to the roots. It is important to note that as research with EEF progresses, it has been discovered that their success on the capacity of colonization and growth promotion of host plants depends on the methodology used for inoculation (Jaber and Enkerli, 2016; Bamisile *et al*., 2018a) and some of the main EEF mechanisms of action involved in generating enhanced pest control or disease resistance, include the following: A) Toxin and enzyme production, an example of this is the fungus *Aspergillus sojae* Sakaguchi & K. Yamada ex Murakami, 1971, which was isolated from the oregano plant *Coleus amboinicus* Lour, 1790 (Lamiaceae) and determined the production of toxic enzymes such as 2-furancarboxaldehyde and levoglucosenone on the cotton leaf worm *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), where when applied on L_3 larvae of *S. litura* by dipping, 57 % mortality was recorded (Elango *et al*., 2020); B) Competition for nutrients, this is due to the fact that EEF colonize the interior of plants and compete with phytophagous insects for available nutrients. Thus, *Acremonium alternatum* Link, 1809 caused L_1 larvae of *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) feeding on leaves of previously inoculated cabbage plants to show mortality

during the first 10 days of development (Raps and Vidal, 1998); C) Induction of resistance in the host plant, EEF has been shown to be able to biosynthesize "phytochemicals" originally thought to be produced only by their host plants, which induce defense responses in the host plant against diseases (Ancheeva *et al*., 2020). For example, in a study by Russo *et al*. (2015), it was shown that the foliar spraying of *B. bassiana* turned out to be more successful than the inoculation of seeds in tobacco, corn, wheat, and soybean plants which promoted the growth of these crops. In any case, it is important to standardize the methodologies for its inoculation, as well as to consider the concentration of conidia to be applied (Jaber and Enkerli, 2017; Javed *et al*., 2019). Besides, the implementation of EEF in agro-food production requires to a great extent, the understanding of the biotic and abiotic factors that interact in the plant-fungus relationship. Understanding the effect of these factors and inoculation methods, becomes a challenge for the development of sustainable agricultural production systems (Tall and Meyling, 2018; Vega, 2018). A possible explanation for the limited success obtained with EEF inoculation in seeds and roots, is focused on the competition with other soil-dwelling microorganisms that are transmitted in the same way as EEF: through water currents and wind (Bamisile *et al*., 2018a).

According to the above, it is necessary to identify and understand the effect of other microorganisms, and the soil characteristics that favors or limit the activity of EEF. For instance, Mayerhofer *et al*. (2017) investigated through ribosomal marker sequencing, the possible effects of Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi and Acidobacteria naturally present in soils on the fungus *M. brunneum*. The study was carried out under field conditions for the biological control of *Agriotes* spp. in potato. The results revealed an efficiency of 77 % referring to decrease in tubers damaged by the insect compared to the control, as well as a successful establishment of the fungus in the crop, without negatively affecting the soil microbial communities described above. The foregoing will facilitate its manipulation and effectiveness for the development of technologies with a socially, economically, and ecologically viable approach (Jaber and Enkerli, 2016; Bamisile *et al*., 2018a; Vega, 2018). This approach must consider the ecology of EEF, enhancing their development and the availability of a greater number of products on a commercial scale for use in current agriculture (Jaber and Ownley, 2017). It should also be considered that among the desired characteristics of EEF strains, are a broad spectrum towards pest species, greater persistence, stimulation of plant growth, and the compatibility with other IPM (included chemical pesticides) strategies under greenhouse and field conditions (Gathage *et al*., 2016; Clifton *et al*., 2018; Mantzoukas and Grammatikopoulos, 2020).

The successful positioning of EEF as biological control agents widely used worldwide requires developing standard application methodologies under field conditions. In this regard, the factors that influence the development of fungi should be investigated (*e. g.* UV radiation and humidity). This will make possible to exploit all the beneficial capacities of such important microorganisms (Jaber and Ownley, 2017; Vega, 2018).

An important aspect to highlight is the compatibility of EEF with entomophagous insects (Gathage *et al*., 2016; González-Mas *et al*., 2019), which expands the possibilities in their use in IPM. For instance, the survival of the predator *Rhynocoris marginatus* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Reduviidae) was not affected when it fed on larvae of *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) infected with the fungi *I. fumosorosea* and *B. bassiana* (Ullah *et al*., 2019). These results suggest that EEF are compatible to be used together with the predator to promote the biological control of *S. litura*.

On the other hand, studies are needed to document the persistence of EEF in natural environments inside and outside their host plant. In one of them, it was documented that cotton seeds inoculated with the fungi *B. bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones and Samson 2011 (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae), showed a successful endophytic colonization in the seedlings; its persistence fluctuated from 7 to 14 days after application under greenhouse conditions, and its presence limited the incidence of the aphid *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) (Lopez *et al*., 2014). It has been documented that in some cases the persistence of the fungi in endophytic form can be reduced with the age of the plant. For example, *B. bassiana* as endophyte of corn plants can persist up to 60 days in the culture. However, its persistence was reduced (44.44 ± 11.11 %) with the increase in the age of the plant, documenting that upon reaching 75-90 days of age, the persistence of the fungus was null. This was manifested in the protection against the corn stem borer *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Crambidae) (Renuka *et al*., 2016). Therefore, knowing in detail the persistence of EEF colonization within the plant will allow better results to be obtained.

Another important criterion to consider is the maintenance of shelf viability and pathogenicity. It is known that subcultures of entomopathogenic fungi in an artificial medium tend to reduce their pathogenicity (Jaber and Ownley, 2017). Given this fact, it is necessary to carry out continuous maintenance of the EEF isolates and to avoid the loss of these capacities, being recommendable to keep the isolates in tubes with sterile distilled water (Richter *et al*., 2016). For its part, current research on the potential of EEF as endophytic indicates the need to study the effects of the interactions between EEF strains genotype and plant genotype, with the aim of selecting the most compatible isolates to obtain higher levels of success in the plant colonization, considering the environmental conditions surrounding the fungus and its host, as well as the need to carry out studies under greenhouse and field conditions (Busby *et al*., 2016; Kumar *et al*., 2018).

PERSPECTIVES

One question we must ask ourselves is, if endophytic fungi have coevolved with plants, why is it that the crops have lost them? In other words, what will be the difference in endophytic fungi between crop wild relatives, landraces, and modern varieties? If the association between endophytic fungi-plants is natural as part of evolution, why is it necessary to induce colonization in crops? Experiences with native Mexican varieties of tomato, *Solanum lycopersicum*, have shown greater tolerance to pests than commercial varieties. Although it is presumed that a higher density of trichomes was the cause of the resistance (Nord *et al*., 2020), could endophytic fungi be involved? When the native varieties were grafted with the commercial variety, they transmitted resistance to the previously susceptible commercial variety. So, a good strategy to induce EEF colonization would be the grafting of commercial varieties in wild plants. EEF has become an ecologically alternative for crop protection by inducing their growth and resistance to pests and diseases. This lays the foundation for the generation of new EEF-based products (Bamisile *et al*., 2018a).

As detailed in this review, a great effort has been made to unravel the potential of EEF, carrying out recent studies that have made possible a better understanding of their behavior and mechanisms of action. However, only 1 to 2 % of known plant species have endophytic associations with EEF (Khare *et al*., 2018). Likewise, the current scenario indicates that it is also necessary to understand the biochemistry and physiology of EEF with the support of modern genomics, metabolomics, and proteomics techniques, given that there is little known research in these fields so far (Pathan and Deshpande, 2019; Putnoky-Csicsó *et al*., 2020). Therefore, knowing in detail the physiological functioning of EEF will be of fundamental importance to contribute to the solution of many of the problems that overwhelm current agricultural production. In this sense, the resistance that EEF induce in host plants against insect pests and pathogens, could potentially reverse the negative impacts of conventional agricultural production by emphasizing research in the development of commercial formulations based on these fungi (Khare *et al*., 2018). These formulations must address the lack of success in the inoculation of seeds and roots, solving the problem of microbial competition that occurs in the rhizosphere, which is considered the main cause of failure (Jaber and Enkerli, 2017; Javed *et al*., 2019).

Finally, to be more successful in the development of commercial formulations, it is necessary to understand the following premises: 1) To support the study of the genetic and molecular bases that regulate the communication between plant-endophyte (Bamisile *et al*., 2018a; Dara, 2019); 2) To promote the development of application methodologies to establish a successful association between EEF and host plant, as well as its survival (Lopez *et al*., 2014; Renuka *et al*., 2016; Mantzoukas and Eliopoulos, 2020); 3) To understand more deeply the mechanisms that influence the protection of the plant against insects and pathogens (Yun *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018; Ahmad *et al*., 2020); 4) To determine the impact of biotic and abiotic factors that mediate the success of the EEF (Tall and Meyling, 2018; Vega, 2018) and; 5) To understand in detail both, horizontal and vertical transmission routes, since it is recently known that EEF are capable of being transmitted through the reproductive tissues of plants, at least, to the next generation (Khare *et al*., 2018).

CONCLUSION

This review examined the integrative status of entomopathogenic fungi and their role as endophytes, as well as their limitations and disadvantages of their use in the current monoculture-based agricultural paradigm, where endophytic fungi and any other sustainable pest management strategy, experience a high challenge because modern agroecosystems are designed to express high productivity, and do not necessarily favor the presence and increase of beneficial organisms. Therefore, further research on this alternative is needed to promote healthier and more sustainable agricultural production.

ACKNOWLEDGMENTS

O.G. Gutiérrez-Cárdenas acknowledges the Government of Mexico and the National Council of Humanities, Sciences and Technologies (CONAHCYT) for the Ph.D. research grant (no. of scholarship 717880-2018).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M., Luthe, D.S., Shakeel, S.N. and Barbercheck, M.E. 2020. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. Biological Control. 144: 104167.

Ai-Tian, R., Mickan, B.S., Ji-Yuan, L., Zhou, R., Xu-Cheng, Z., Ming-Sheng, Ma., Wesly, K. and You-Cai, X. 2021. Soil labile organic carbon sequestration is tightly correlated with the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid maize fields. Land Degradation & Development. 32: 1224-1236.

Ambele, C.F., Ekesi, S., Bisseleua, H.D., Babalola, O.O., Khamis, F.M., Djuideu, C.T. and Akutse, K.S. 2020. Entomopathogenic fungi as endophytes for biological control of subterranean termite pests attacking cocoa seedlings. Journal of Fungi. 6: 126.

Ancheeva, E., Daletos, G. and Proksch, P. 2020. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. Current Medicinal Chemistry. 27: 1836-1854.

Andersen, C.B., Aleklett, K., Digdarshika, G., Lankinen, Å. and Grenville-Briggs, L.J. 2024. *Pythium oligandrum* induces growth promotion in starch potato without significantly altering the rhizosphere microbiome. Applied Soil Ecology. 199: 105423.

Araus, J.L., Serret, M.D. and Lopes, M.S. 2019. Transgenic solutions to increase yield and stability in wheat: shining hope or flash in the pan?. Journal of Experimental Botany. 70: 1419-1424.

Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K.S., Keppanan, R. and Wang, L. 2018b. Fungal endophytes: beyond herbivore management. Frontiers in Microbiology. 9: 544.

Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K.S., Keppanan, R., Afolabi, O.G., Hussain, M., Qasim, M. and Wang, L. 2018a. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. Microbiological Research. 217: 34-50.

Barelli, L., Moonjely, S., Behie, S.W. and Bidochka, M.J. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. Plant Molecular Biology. 90: 657-664.

Behie, S.W., Moreira, C.C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P.M. and Bidochka, M.J. 2017. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. Nature Communications. 8: 1-5.

Bing, L.A. and Lewis, L.C. 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Biocontrol Science and Technology. 2: 39-47.

Bruinsma, M., Kowalchuk, G.A. and van Veen, J.A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. Biology and Fertility of Soils. 37: 329-337.

Busby, P.E., Ridout, M. and Newcombe, G. 2016. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. Plant Molecular Biology. 90: 645-655.

Canassa, F., Esteca, F.C., Moral, R.A., Meyling, N.V., Klingen, I. and Delalibera, I. 2020. Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the twospotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. Journal of Pest Science. 93: 261-274.

Carvalho, F.P. 2017. Pesticides, environment, and food safety. Food and Energy Security. 6: 48-60.

Chen, Z., Jin, Y., Yao, X. Chen, T., Wei, X., Li, C., White, J.F. and Nan, Z. 2020. Fungal endophyte improves survival of *Lolium perenne* in low fertility soils by increasing root growth, metabolic activity and absorption of nutrients. Plant Soil. 452: 185-206.

Clifton, E.H., Jaronski, S.T., Coates, B.S., Hodgson, E.W. and Gassmann, A.J. 2018. Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. PLoS One. 13: e0194815.

da Costa Stuart, A.K., Stuart, R.M. and Pimentel, I.C. 2018. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merril). Agriculture and Natural Resources. 52: 388-392.

Dara, S.K. 2019. Non-entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. Insects. 10: 277.

Dara, S.K., Dara, S.S.R. and Dara, S.S. 2017. Impact of entomopathogenic fungi on the growth, development, and health of cabbage growing under water stress. American Journal of Plant Sciences. 8: 76194.

Dara, S.K., Dara, S.S., Dara, S.S.R. and Anderson, T. 2016. First report of three entomopathogenic fungi offering protection against the plant pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum. E-Journal of Entomology and Biologicals.

De Souza Vieira, P.D., de Souza Motta, C.M., Lima, D., Braz Torres, J., Quecine, M.C., Azevedo, J.L. and de Oliveira, N.T. 2011. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. Mycology. 2: 91-97.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Tigchelaar, M., Battisti, D.S., Merrill, S.C., Huey, R.B. and Naylor, R.L. 2018. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. Science. 361: 916-919.

Devi, G. 2018. Nematophagous fungi: *Metarhizium anisopliae*. International Journal of Environmental Research. 3: 2110-2113.

Elango, D., Manikandan, V., Jayanthi, P., Velmurugan, P., Balamuralikrishnan, B., Ravi, A. V. and Shivakumar, M.S. 2020. Selection and characterization of extracellular enzyme production by an endophytic fungi *Aspergillus sojae* and its bio-efficacy analysis against cotton leaf worm, *Spodoptera litura*. Current Plant Biology. 23: 100153.

Fontana, D.C., de Paula, S., Torres, A.G., de Souza, V.H.M., Pascholati, S.F., Schmidt, D. and Dourado-Neto, D. 2021. Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. Pathogens. 10: 570.

Ganesan, M., Lee, H.Y., Kim, J.I. and Song, P.S. 2017. Development of transgenic crops based on photo-biotechnology. Plant, Cell & Environment. 40: 2469-2486.

Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Amarilla, S.P., Ríos-Moreno, A., Carrasco, L. and Quesada-Moraga, E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia taba*ci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). Journal of Pest Science. 90: 319-330.

Gathage, J.W., Lagat, Z.O., Fiaboe, K.K.M., Akutse, K.S., Ekesi, S. and Maniania, N.K. 2016. Prospects of fungal endophytes in the control of *Liriomyza* leafminer flies in common bean *Phaseolus vulgaris* under field conditions. BioControl. 61: 741-753.

Getahun, M.N., Biasazin, T.D., Wolde-Hawariat, Y., Bengtsson, J.M., Hillbur, Y. and Seyoum, E. 2016. *Metarhizium* sp. isolated from dead *Pachnoda interrupta* (Coleoptera: Scarabaeidae) as a potential entomopathogenic fungus for the pest insect: proof-of-concept for autodissemination. International Journal of Tropical Insect Science. 36: 1-9.

González-Mas, N., Cuenca-Medina, M., Gutiérrez-Sánchez, F. and Quesada-Moraga, E. 2019. Bottom-up effects of endophytic *Beauveria bassiana* on multitrophic interactions between the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and its natural enemies in melon. Journal of Pest Science. 92: 1271-1281.

González-Guzmán, A., Sacristán, D., Quesada-Moraga, E., Torrent, J. del Campillo, M.C. and Sánchez-Rodríguez, A.R. 2020. Effects of entomopathogenic fungi on growth and nutrition in wheat grown on two calcareous soils: Influence of the fungus application method. Annals of Applied Biology. 177: 26-40.

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M.I., Ortiz, V., Vega, F.E., Kramer, M. and Parsa, S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control. 95: 40-48.

Gutiérrez-Cárdenas, O.G., Cortez-Madrigal. H., Malo, E.A., Gómez-Ruíz, J. and Nord, R. 2019. Physiological and pathogenical characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of adult *Spodoptera frugiperda*. Southwestern Entomologist. 44: 409-421.

Jaber, L.R. and Enkerli, J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. Biological Control. 103: 187-195.

Jaber, L.R. and Enkerli, J. 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. Biocontrol Science and Technology. 27: 28-41.

Jaber, L.R. and Ownley, B.H. 2017. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. Biological Control. 116: 36-45.

Jaber, L.R. 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. Planta. 248: 1525-1535.

Javed, K., Javed, H., Mukhtar, T. and Qiu, D. 2019. Pathogenicity of some entomopathogenic fungal strains to green peach aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae). Egyptian Journal of Biological Pest Control. 29: 1-7.

Kabaluk, J.T., Lafontaine, J.P. and Borden, J.H. 2015. An attract and kill tactic for click beetles based on *Metarhizium brunneum* and a new formulation of sex pheromone. Journal of Pest Science. 88: 707-716.

Khan, M.A., Wahid, A., Ahmad, M., Tahir, M.T., Ahmed, M., Ahmad, S. and Hasanuzaman, M. 2020. World cotton production and consumption: An overview. In: Cotton production and uses. S. Ahmad and M. Hasanuzzaman (eds.), pp 1-7. Springer, Singapore.

Khare, E., Mishra, J. and Rora, N.K. 2018. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. Frontiers in Microbiology. 9: 2732.

Kumar, D. and Kalita, P. 2017. Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. Foods. 6: 8.

Kumar, C.S., Jacob, T.K., Devasahayam, S., Thomas, S. and Geethu, C. 2018. Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. Microbiological Research. 207: 153-160.

Kumar, M., Yusuf, M.A. and Nigam, M. 2018. An update on genetic modification of chickpea for increased yield and stress tolerance. Molecular Biotechnology. 60: 651-663.

Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D. and Munier-Jolain, N. 2017. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. Nature Plants. 3: 1-6.

Lee, Y.S. and Kim, Y.C. 2019. Tobacco growth promotion by the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica* pf185. Mycobiology. 47: 126-133.

Lopez, D.C., Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M.J. and Sword, G.A. 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. PLoS One. 9: e103891.

Lu, B.R. and Yang, C. 2009. Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. Biotechnology Advances. 27: 1083-1091.

Mantzoukas, S. and Eliopoulos, P.A. 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. Applied Sciences. 10: 360.

Mantzoukas, S. and Grammatikopoulos, G. 2020. The effect of three entomopathogenic endophytes of the sweet sorghum on the growth and feeding performance of its pest, *Sesamia nonagrioides* larvae, and their efficacy under field conditions. Crop Protection. 127: 104952.

Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam, N.M. and Conrath, U. 2016. Recognizing plant defense priming. Trends in Plant Science. 21: 818-822.

Mayerhofer, J., Eckard, S., Hartmann, M., Grabenweger, G., Widmer, F., Leuchtmann, A. and Enkerli, J. 2017. Assessing effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* on soil microbial communities in *Agriotes* spp. biological pest control. FEMS Microbiology Ecology. 93: fix117.

McKinnon, A.C., Saari, S., Moran-Diez, M.E., Meyling, N.V., Raad, M. and Glare, T.R. 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. BioControl. 62: 1-17.

Mfuti, D.K., Subramanian, S., van Tol, R.W., Wiegers, G.L., de Kogel, W.J., Niassy, S., du Plessis, H., Ekesi, S. and Maniania, N.K. 2015. Spatial separation of semiochemical lurem-TR and entomopathogenic fungi to enhance their compatibility and infectivity in an autoinoculation system for thrips management. Pest Management Science. 72: 131-139.

Mohamed, A.H., Abd El-Megeed, F.H., Hassanein, N.M., Youseif, S.H., Farag, P.F., Saleh, S.A., Abdel-Wahab, B.A., Alsuhaibani, A.M., Helmy, Y.A. and Abdel-Azeem, A.M. 2022. Native rhizospheric and endophytic fungi as sustainable sources of plant growth promoting traits to improve wheat growth under low nitrogen input. Journal of Fungi. 8: 94.

Mora-Aguilera, G., Cortez-Madrigal, H. and Acevedo-Sánchez, G. 2017. Epidemiology of entomopathogens: Basis for rational use of microbial control of insects. Southwestern Entomologist. 42: 153-169.

Morjan, W.E., Pedigo, L.P. and Lewis, L.C. 2002. Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. Environmental Entomology. 31: 1206-1212.

Nord, R., Cortez-Madrigal, H., Rodríguez-Guzmán, E., Villar-Luna, E. and Gutiérrez-Cárdenas, O.G. 2020. Grafting wild tomato genotypes and Mexican landraces increases trichome density and resistance against pests. Southwestern Entomologist. 45: 649-662.

Pathan, E.K. and Deshpande, M.V. 2019. The puzzle of highly virulent *Metarhizium anisopliae* strains from *Annona squamosa* fields against *Helicoverpa armigera*. Journal of Basic Microbiology. 59: 392-401.

Pérez-González, O. and Sánchez-Peña, S.R. 2017. Compatibility *in vitro* and *in vivo* of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Hirsutella citriformis* with selected insecticides. Southwestern Entomologist. 42: 707-718.

Putnoky-Csicsó, B., Tonk, S., Szabó, A., Márton, Z., Bogdányi, F.T., Tóth, F., Abod, É., Bálint, J. and Balog, A. 2020. Effectiveness of the entomopathogenic fungal species *Metarhizium anisopliae* strain NCAIM 362 treatments against soil inhabiting *Melolontha melolontha* larvae in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Journal of Fungi. 6: 116.

Quesada-Moraga, E. 2020. Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. Biocontrol Science and Technology. 30: 864-867.

Ramakuwela, T., Hatting, J., Bock, C., Vega, F.E., Wells, L., Mbata, G.N. and Shapiro-Ilan, D. 2020. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoinensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. Biological Control. 140: 104102.

Raps, A. and Vidal, S. 1998. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant-herbivorous insect interactions. Oecologia. 114: 541-547.

Renuka, S., Ramanujam, B. and Poornesha, B. 2016. Endophytic ability of different isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in stem and leaf tissues of maize (*Zea mays* L.). Indian Journal of Microbiology. 56: 126-133.

Richter, D.L., Dixon, T.G. and Smith, J.K. 2016. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 30 years in cold storage in sterile water. Canadian Journal of Microbiology. 54: 595-599.

Rivas-Franco, F., Hampton, J.G., Narciso, J., Rostás, M., Wessman, P., Saville, D.J., Jackson, T.A. and Glare, T.R. 2020. Effects of a maize root pest and fungal pathogen on entomopathogenic fungal rhizosphere colonization, endophytism and induction of plant hormones. Biological Control. 150: 104347.

Russo, M.L., Pelizza, S.A., Cabello, M.N., Stenglein, S.A. and Scorsetti, A.C. 2015. Endophytic colonization of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). Biocontrol Science and Technology. 25: 475-480.

Russo, M.L., Pelizza, S.A., Vianna, M.F., Allegrucci, N., Cabello, M.N., Toledo, A.V., Mourelos, C. and Scorsetti, A.C. 2019. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. Journal of King Saud University Science. 31: 728-736.

Sánchez-Rodríguez, A.R., Raya-Díaz, S., Zamarreño, Á.M., García-Mina, J.M., del Campillo M.C. and Quesada-Moraga, E. 2018. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. Biological Control. 116: 90-102.

Stone, L.B. and Bidochka, M.J. 2020. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 104: 9935-9945.

Sun, T., Shen, Z., Shaukat, M., Du, C. and Ali, S. 2020. Endophytic isolates of *Cordyceps fumosorosea* to enhance the growth of *Solanum melongena* and reduce the survival of whitefly (*Bemisia tabaci*). Insects. 11: 78.

Tall, S. and Meyling, N.V. 2018. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. Microbial Ecology. 76: 1002-1008.

Tsatsakis, A.M., Nawaz, M.A., Kouretas, D., Balias, G., Savolainen, K., Tutelyan, V.A., Golokhvast, K.S., Lee, J.D., Yang, S.H. and Chung, G. 2017. Environmental impacts of genetically modified plants: a review. Environmental Research. 156: 818-833.

Ullah, M.I., Altaf, N., Afzal, M., Arshad, M., Mehmood, N., Riaz, M., Majeed, S., Ali, S., and Abdullah, A. 2019. Effects of entomopathogenic fungi on the biology of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its reduviid predator, *Rhynocoris marginatus* (Heteroptera: Reduviidae). International Journal of Insect Science. 11: 1-7.

Vega, F.E. and Blackwell, M. 2005. Insect-fungal associations: Ecology and evolution. Oxford University Press: Oxford, U.K.

Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzón, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N. and Roy, H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology. 2: 149-159.

Vega, F.E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia. 110: 4-30.

Veloz-Badillo, G.M., Riveros-Ramírez, J., Angel-Cuapio, A., Arce-Cervantes, O., Flores-Chávez, B., Espitia-López, J., Loera, O. and Garza-López, P.M. 2019. The endophytic capacity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* caused inherent physiological response in two barley (*Hordeum vulgare*) varieties. 3 Biotech. 9: 1-6.

Wang, Q., Wang, C., Wei, Y., Yao, W., Lei, Y. and Sun, Y. 2022. Soil microbes drive the flourishing growth of plants from *Leucocalocybe mongolica* fairy ring. Frontiers in Microbiology. 13: 893370.

Wari, D., Okada, R., Takagi, M., Yaguchi, M., Kashima, T. and Ogawara, T. 2020. Augmentation and compatibility of *Beauveria bassiana* with pesticides against different growth stages of *Bemisia tabaci* (Gennadius); an *in vitro* and field approach. Pest Management Science. 76: 3236-3252.

Wei, Q.Y., Li, Y.Y., Xu, C., Wu, Y.X., Zhang, Y.R. and Liu, H. 2020. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. Arthropod-Plant Interactions. 14: 289-300.

Win, P.M., Matsumura, E. and Fukuda, K. 2021. Effects of pesticides on the diversity of endophytic fungi in Tea plants. Microbial Ecology. 82: 62-72.

Yun, H.G., Kim, D.J., Gwak, W.S., Shin, T.Y. and Woo, S.D. 2017. Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest *Myzus persicae* and phytopathogen *Botrytis cinerea*. Mycobiology. 45: 192-198.

Zeng, Q., Dong, J., Lin, X., Zhou, X. and Xu, H. 2024. Isolation and identification of *Acer truncatum* endophytic fungus *Talaromyces verruculosus* and evaluation of its effects on insoluble phosphorus absorption capacity and growth of cucumber seedlings. Journal of Fungi. 10: 136.

Zhou, S., Qiu, H., Feng, C., Guo, Y., Wang, X. and Chen, C. 2016. Impact of deltamethrin on the endophytic fungal community of a Chinese cabbage, *Brassica chinensis*. Chemistry and Ecology. 32: 259-269.